

**Metabolismo ruminal de los ácidos grasos de cadena larga,
comunidades microbianas y calidad de leche de oveja bajo
suplementación energética contrastante: almidón versus fibra de alta
degradabilidad.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Florencia Estefanía Miccoli

Ingeniera Zootecnista, FCA-UNLZ 2010; Magister en Cs. Agrarias, UNS 2014

Lugar de trabajo: Cátedra de Nutrición Animal – FCA, UNLZ
Catedra Bovinos de Carne - Dpto. Producción Animal - FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Darío Colomatto

Ingeniero Agrónomo (UBA)

PhD, University of Reading, UK.

Co-director

Rafael Alejandro Palladino

Ingeniero Agrónomo (UBA)

PhD, University College Dublin (UCD), Ireland.

JURADOS DE TESIS

Dra. Lilia Cavaglieri, UNAC.

Dr. Roberto Distel, UNS.

Dr. Mauricio Giuliadori, UNLP.

Fecha de defensa de tesis: 28 de marzo de 2019.

Dedicatoria.

A mi querida familia...

mis dos grandes referentes, mis papás, José y Pilar.

mis hermanos y amigos, Anto y Pablo.

Agradecimientos

- A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNLZ por brindarme la formación académica como Ing. Zootecnista y apoyar siempre mis estudios de posgrado tanto de magister como de doctorado.
- Al Ing. Agr. (PhD) Alejandro Palladino, quien no sólo ha sido un guía en todo este proceso del doctorado, sino la persona que me abrió puertas, me conectó con investigadores de Argentina y de otras partes del mundo, me mostró que no existen los límites para crecer, que lo importante es confiar en uno mismo y en lo que somos capaces. Me abrió un espacio como tesista y me trató siempre como un “par”. Por su dirección, sus ideas, enseñanza, dedicación y constante apoyo a lo largo de estos años, tanto en lo académico como en lo personal. Infinitas gracias Alejandro por darme alas y confianza para volar.
- Al Ing. Agr. (PhD) Darío Colombatto por su apoyo como director y guía en mi formación de posgrado y mi formación en el área de Bovinos de Carne, donde tengo la posibilidad de seguir aprendiendo de él a través de la docencia, la dirección conjunta de tesistas y la vinculación con el medio.
- Al Departamento de Producción Animal de la FAUBA por brindarme el espacio para realizar mis ensayos, pero muy especialmente, agradezco al Ing. Agr. (MSc.) José Danelón, quien me abrió las puertas de la cátedra de Nutrición y Alimentación Animal donde inicié mi carrera en la UBA y ha sido y sigue siendo un gran referente en mi vida. Construyó un gran equipo de trabajo e investigación que, sin lugar a dudas, son parte de los resultados de esta tesis.

- A Susana Thomson por la capacitación y colaboración que recibí en el Laboratorio de Nutrición Animal donde realicé todos los análisis de evaluación de alimentos de este trabajo de tesis, siempre con buena predisposición y compañerismo.
- A Rocío Martínez, Juan Cantet, Patricia Allocati, Paola Gambetti, Jesica Iorio, Nicolás Juliano, Federico Hidalgo, Margarita Guzman, por su apoyo, estímulo y compañía, como grupo de trabajo y, más especialmente, como grupo de amigos.
- A la Dra. Carolina Pérez, por abrirme las puertas del Laboratorio de Alimentos y posibilitarme avanzar con la tesis en un momento tan difícil. Por enseñarme una técnica nueva, abrir el juego a la discusión sobre nutrición animal y nutrición humana, por reforzar mi interés en la ciencia y por ser el nexo hacia el camino futuro. Gracias por ser guía y amiga.
- A mis tesistas, Román, Ramiro, Mariano, Santiago, Gaby, Joaquín y Mariano por su colaboración en los ensayos, su compromiso con la catedra, su responsabilidad con las tesinas pero, fundamentalmente, gracias porque me dieron mucha energía e impulso para seguir adelante y compartir a través de la enseñanza este trabajo que tanto amo.
- Al Dr. Dengpan Bu por financiar parte de la estancia doctoral que realicé en el CAAS, China, y darme un lugar como conferencista en el WorkCSop de Lecheria. A la Dra. Peng Peng Wang por su apoyo, su amistad y todo cuanto aprendí no sólo en el ámbito científico, sino en el ámbito sociocultural en un país maravilloso.
- Al Dr. Mathew McCabe por enseñarme las técnicas de biología molecular y secuenciación para realizar mi último experimento relacionado con el estudio de microbioma ruminal por NGS. Al Dr. David Kenny, por brindarme la posibilidad de realizar una estancia doctoral en el Bioscience Laboratory en Teagasc Grange,

Irlanda y financiar los análisis. A mi familia de Irlanda, Aiveen y John, quienes abrieron las puertas de su hogar e hicieron posible mi formación en el Teagasc.

- A mis papás, José y Pilar, mis referentes, su apoyo incondicional fue, sin lugar a dudas, la posibilidad de estudiar, formarme, viajar, aprender, escribir, publicar, ir al campo, trabajar de lo que amo....siempre. Gracias por creer una vez mas, por no dejar que me rinda. Gracias por ayudarme a lograr este gran proyecto personal en el camino de la ciencia.
- Finalmente, quiero hacer una especial mención a las tres personas a quienes agradezco el haberme brindado su ayuda en todo momento. Ya que mi primer ensayo lo arranque con ustedes, en nuestro departamento de Almagro...ya que la escritura la empecé con vos, en nuestra nueva vida juntos...

Gracias por enseñarme que no importa lo que estudiamos ó de lo que trabajemos, somos parte de un mismo equipo y dentro de ese equipo pueden forjarse las más valiosas amistades...Pablo, Anto y Lean... Gracias totales.

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”.

ÍNDICE GENERAL

<i>Dedicatoria</i>	iii
<i>Agradecimientos</i>	iv
<i>Declaración</i>	vii
Índice general	viii
Índice de cuadros	x
Índice de figuras	xii
Resumen	xiv
Abstract.....	xvii
CAPITULO 1.	1
Ácidos grasos poliinsaturados y salud humana	
1.1.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2.ÁCIDOS GRASOS: CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA	2
1.3. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN RUMIANTES.....	2
1.4. EL ROL DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS AG.....	4
1.5. HIPÓTESIS GENERAL.....	5
1.6. OBJETIVO GENERAL	5
CAPITULO 2.....	6
Efecto de la fuente de energía suplementada sobre la producción, composición química y perfil de ácidos grasos de la leche	
2.1. INTRODUCCIÓN.....	6
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.2.1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
2.2.2. MUESTREOS Y ANÁLISIS.....	8
2.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
2.3.1. CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD.....	12
2.3.2. PRODUCCION Y CALIDAD DE LECHE.....	15
2.3.3. PERFIL DE AG DE LA LECHE.....	16
2.4. CONCLUSIONES	19
CAPITULO 3.	20
Efecto de la fuente de energía suplementada sobre el medio ambiente ruminal y el metabolismo de los aacidos grasos.....	

3.1.INTRODUCCIÓN	20
3.2.MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.2.1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	20
3.2.2. MUESTREOS Y ANÁLISIS	22
3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
3.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.3.1. CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD	26
3.3.2. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LECHE	27
3.3.3. AMBIENTE RUMINAL	30
3.3.4. PERFIL DE AG EN RUMEN	34
3.4.CONCLUSIONES	36
CAPITULO 4.	38
Suplementación energetica contrastante y microbioma ruminal	
4.1.INTRODUCCIÓN	38
4.2.MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.2.1. MUESTREO DE CONTENIDO RUMINAL	40
4.2.2. EXTRACCIÓN DE DNA	40
4.2.3. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA Y SECUENCIACIÓN	40
4.2.4. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN	41
4.2.5. ANÁLISIS ESTADISTICO	41
4.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.3.1. OTUS, RIQUEZA Y DIVERSIDAD MICROBIANA	42
4.3.2. CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE PHYLUM	47
4.3.3. ASIGNACIONES TAXONÓMICAS Y CARACTRIZACIÓN A NIVEL DE GÉNERO	47
4.4. BIOHIDROGENACIÓN Y MICROBIOMA BACTERIANO: PASOS METABÓLICOS Y GENEROS DEL "A AND B GROUPS"	51
4.5. CONCLUSIONES	57
CAPÍTULO 5	60
Analizando el esquema completo: Dieta - Rumen - Leche	60
BIBLIOGRAFÍA	64
Anexos	78

ÍNDICE DE CUADROS

Título	Página
Cuadro 1. Composición química de los alimentos que integran el suplemento.....	9
Cuadro 2. Perfil de ácidos grasos de los alimentos que integran el suplemento.....	9
Cuadro 3. Composición química de raigrás fresco en los distintos tiempos de muestreo (I, II y III).....	10
Cuadro 4. Perfil de ácidos grasos de raigrás fresco en los distintos tiempos de muestreo (I, II y III).....	10
Cuadro 5. Efecto de la fuente energética suplementada sobre la performance animal.....	13
Cuadro 6. Perfil de ácidos grasos de la leche de ovejas suplementadas con fuentes contrastantes de carbohidratos.....	17
Cuadro 7. Composición química de los ingredientes de la dieta, expresados como % en base seca.....	23
Cuadro 8. Perfil de ácidos grasos de los alimentos que componen el suplemento.....	23
Cuadro 9. Composición química del raigrás en los tres periodos experimentales (I, II, III) expresado como % en base seca.....	23
Cuadro 10. Perfil de ácidos grasos de raigrás fresco en los distintos periodos experimentales (I, II y III).....	24
Cuadro 11. Efecto de la fuente energética suplementada sobre la performance animal.....	27
Cuadro 12. Efecto del suplemento energético sobre el ambiente ruminal.....	30
Cuadro 13. Perfil de ácidos grasos en licor ruminal de ovejas suplementadas con fuentes contrastantes de carbohidratos.....	35

Cuadro 14. Número de lecturas por muestra luego de la secuenciación del amplicon de la región V4 del gen 16S rRNA.....	42
Cuadro 15. Estimadores de riqueza y diversidad de la librería genómica 16S rRNA del licor de rumen de oveja a partir del análisis de secuenciación.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Relación entre las concentraciones (g/100g) de trans-11 C18:1 y CLA totales en leche de ovejas.....	18
Figura 2. Efecto de la suplementación con CS o MZ sobre la producción de AGV totales y el pH ruminal a lo largo del día.....	31
Figura 3. Efecto de la suplementación con MZ o CS sobre la dinámica diaria del N-NH ₃	33
Figura 4. Curvas de rarefacción de las OTUs generadas a partir de un 97% de similaridad para las 18 muestras.....	43
Figura 5. Total de microorganismos (N) a nivel de reino (Archaea y Bacteria) para las dietas CS y MZ.....	44
Figura 6. Índices de riqueza (Chao 1, ACE) y diversidad (Shannon, Simpson, Fisher) para cada una de las dietas MZ y CS, y por animal (200, 5111, 9020, 9032, 9105, 9403).....	45
Figura 7. Estructura de la comunidad bacteriana del rumen a nivel de Phylum para las dos dietas: CS y MZ. El grafico de barras representa las RA de los <i>phyla</i> más abundantes y en el cuadro se muestran los valores respectivos de RA en porcentajes (%).....	46
Figura 8. Correlación entre la relacion Firmicutes:Bacteroidetes y el porcentaje de grasa de la leche (g/100g) para ambas dietas.....	47
Figura 9. Relación CS/MZ expresada como “log ₂ fold change” para las asignaciones taxonómicas que difirieron entre dietas ($P \leq 0.05$). La letra delante del nombre indica nivel filogenético: “p”, phylum; “o”, orden; “c”, clase; “f”, familia; “g”, género.	48
Figura 10. Esquema del proceso de BH para la dieta MZ (adaptado de Bauman, 1999.....	52
Figura 11. Esquema del proceso de BH para la dieta CS (adaptado de Bauman, 1999.....	52

Figura 12. Esquema del proceso de BH con grupos bacterianos asociados a los distintos pasos metabólicos (adaptado de Bauman,1999).....	53
Figura 13. Análisis de componentes principales entre los AG de cadena larga y las asignaciones taxonómicas identificadas a nivel de orden, familia y género que difirieron entre dietas ($P < 0.05$). En rojo se marcan los AG vinculados a los pasos metabólicos del proceso de BH.....	54
Figura 14. Análisis de componentes principales entre los parámetros de ambiente ruminal y las 23 asignaciones taxonómicas que difirieron entre dietas ($P < 0.05$). En rojo se marcan los parámetros que caracterizan al ambiente ruminal.....	55
Figura 15. Correlación entre RA del género <i>Butyrivibrio</i> y la relación Acético/Propiónico para ambas dietas en conjunto.....	55
Figura 16. Correlación entre la concentración del isómero trans-10, cis-12 CLA (g/100g FAMES) con la RA del género <i>Blautia</i> para ambas dietas en conjunto.....	57

Resumen

Se estudió la suplementación energética contrastante en carbohidratos: grano de maíz (MZ; almidón) vs. cascarilla de soja (CS; hemicelulosa y celulosa), sobre la biohidrogenación ruminal (BH) de los ácidos grasos (AG) de cadena larga, el microbioma y la calidad de la leche de ovejas en un sistema de base pastoril. En el experimento I se evaluó el consumo (CMS), la digestibilidad (DMS) y la producción (PL), composición química y perfil de AG de leche de ovejas consumiendo raigrás (50:50 F:C). Se utilizaron diez ovejas lecheras (30 DEL; 65.8 ± 8.67 kg de PV) en un DCA con medidas repetidas, con dos tratamientos: CS o MZ (14 d de adaptación y 3 semanas de medición). Los resultados fueron analizados por ANVA con un procedimiento de modelos mixtos (animal como efecto aleatorio y el tratamiento, semana y la interacción como efectos fijos) y las medias comparadas por Tukey ($\alpha = 0,05$). El CMS y de forraje y digestibilidad de FDA fue superior en CS, aunque la DMS fue mayor para MZ ($P < 0.05$). La PL fue un 24% superior en CS (aunque sin diferencias estadísticas), con mayores contenidos de omega-3 y PUFA ($P < 0.05$). En el experimento II, se evaluaron las variables de ambiente ruminal y perfil de AG en rumen. Se utilizaron seis ovejas lecheras con cánula ruminal ($78,19 \pm 13,53$ kg de PV), en un diseño *cross-over* 2x3, bajo la misma dieta y tratamientos que en I. Sobre muestras de licor ruminal (08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 00:00 y 04:00 hs) se determinó pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₄) y ácidos grasos volátiles (AGV). Los resultados fueron analizados igual que en I para un *cross-over*. La relación Ac:Prop, el N-NH₄ y el pH ruminal fueron mayores en CS ($P < 0.05$). El *trans-11* y el C18:1*cis-9* fueron superiores en CS ($P < 0.05$) y el C18:2 y C18:2 *cis-9*, *trans-11* CLA tendieron a ser mayores en MZ (mayor consumo de linoleico; $P < 0.05$). El C18:2 *trans-10*, *cis-12* CLA tendió a ser superior en CS (0,14 vs. 0,09 g/100g AG) ($P < 0.1$). El análisis de

microbioma ruminal se hizo a través de la secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA (bacterias y archaeas) de 18 muestras del Exp. II, utilizando plataforma Illumina MiSeq. Se identificaron 20 phylum bacterianos, lo más abundantes fueron Firmicutes y Bacteroidetes (RA; 54,86% y 34,81% en CS y 69% y 21,15% en MZ; $P < 0.05$) y 90 asignaciones taxonómicas (mayor RA: Clostridiales, *Prevotella*, Bacteroidales, *Methanobrevibacter*, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Treponema* y *Methanosphaera*). Sólo 23 difirieron entre dietas y *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* y *Shuttleworthia* fueron superiores en MZ ($P < 0.05$). Estos dos estuvieron correlacionados entre sí y con el *cis*-9, *trans*-11 CLA ($P < 0.01$; $r=0.79$) y con el *trans*-10, *cis*-12 CLA se correlacionó *Blautia* en CS ($P < 0.01$; $r=0.84$). La suplementación con CS resultó en mayor PL y % de grasa, con un perfil más saludable. La BH difirió entre suplementos, posiblemente por la composición del microbioma. Las correlaciones entre AG y ciertos géneros entre sí podrían contribuir a dilucidar la composición bacteriana de los llamados “grupos A y B” del proceso de BH.

Palabras clave: Biohidrogenación, microbioma ruminal, ácidos grasos en leche.

Abstract

Contrasting sources of energy supplementation (soybean hulls, CS or corn grain, MZ) were evaluated on biohydrogenation (BH) of long chain fatty acids (FA), microbiome and milk fatty acid profile of dairy ewes fed fresh ryegrass. In experiment I, ten mature dairy ewes (30 DIM; 65.8 ± 8.67 kg) were assigned to one of two treatments in a complete randomized design with repeated measures: CS and MZ. Dry matter intake (DMI), NDF and ADF intake, *in vivo* digestibility (DMD), milk production (MP) and composition and milk FA profile were assessed (14 d adaptation and 3 weeks). Data were analyzed in a complete randomized design using the MIXED procedure (sheep was included as a random effect) and means compared by Tukey test ($\alpha = 0.05$) (SAS Institute, 2008). Sheep in CS showed higher DMI and NDF intake. On the opposite, DMD resulted higher in MZ ($P < 0.05$). MP was 24% superior in CS but milk composition and feed conversion did not differ ($P > 0.05$). Omega-3 FA and PUFA were higher in CS ($P < 0.01$). In experiment II, rumen parameters were evaluated (pH, total VFA, acetic, propionic, butyric acid, Ac/Prop ratio, N-NH₄ at 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00 and 4:00 h) and rumen FA profile under the same diet as in Exp. I. Six mature fistulated sheep (30 DIM; 78.2 ± 13.53 kg) were assigned to treatments: CS and MZ, 3 ewes in each treatment in a *crossover* design (2x3). Data were analyzed as a *crossover* design (SAS Institute, 2008), and means compared by Tukey test ($\alpha = 0.05$). Rumen pH, Ac:Prop ratio and N-NH₄ were significantly higher in CS ($P < 0.05$). *Trans-11* C18:1 and C18:1c9 concentrations were higher in MZ in contrast with C18:3, C18:4 and C20:4. Linoleic acid (LA) and *cis-9*, *trans-11* CLA contents tended to be higher in MZ (higher intake of LA precursors in MZ diet; $P < 0.05$) and C18:2 *trans-10*, *cis-12* tended to be higher in CS ($P < 0.1$). The last study consisted in microbiome analysis using Illumina MiSeq platform. The V4 region of

the 16S rRNA gene in bacteria and archaea was PCR amplified with Illumina adapter fusion primers to generate 18 amplicon libraries. Twenty bacterial phyla were identified, Firmicutes and Bacteroidetes were the most abundant (54.86% and 34.81% CS; 69% and 21.15% MZ); 90 taxonomic assignments were generated (most abundant: Clostridiales, *Prevotella*, *Methanobrevibacter*, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae and *Butyrivibrio*. and 23 were significantly changed between CS and MZ ($P < 0.05$). Only genera *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* and *Shuttleworthia* were increased in MZ. *Shuttleworthia* had a strong correlation with *Butyrivibrio* and both genus were significantly correlated with *cis*-9, *trans*-11 CLA in rumen ($P < 0.01$; $r=0.79$). In the *trans*-10 pathway, the *trans*-10, *cis*-12 CLA showed a strong correlation with *Blautia* ($P<0.01$; $r=0.84$), which was increased in CS diet ($P < 0.05$). CS supplementation produced more milk and fat content, with a healthier FA profile. BH patterns showed some differences in relation to reports in dairy cows for similar diets, possibly due to microbiome composition. Hopefully, these correlations possibly contribute to complete the “A and B groups” bacteria involved in BH process.

Keywords: Biohydrogenation, rumen microbiome, milk fatty acids.

CAPÍTULO 1.

Ácidos grasos poliinsaturados y salud humana

1.1. Introducción general.

En la década de los 90, DeFelice acuñó el término de “nutracéuticos” en su trabajo titulado “The nutraceutical revolution: its impact on food industry” para referirse a este tipo de compuestos a los cuales definió como sustancias que poseen un efecto beneficioso sobre la salud por encima de la nutrición convencional. Finley (2016) ha puesto en escenario de discusión el concepto de “nutracéuticos” en su reciente trabajo “The nutraceutical revolution: Emerging vision or broken dream? Understanding scientific and regulatory concerns”, indicando que aún no existe una definición legal en la industria alimentaria para este término, que suele utilizarse habitualmente para referirse a “alimentos funcionales”.

Teniendo una visión más amplia que las meras definiciones, la investigación en el área de alimentos ha profundizado en los últimos años en la comprensión del rol de los ingredientes como moduladores de las funciones fisiológicas. Su importancia radica en la participación que tienen algunos compuestos en la prevención y reducción del riesgo de enfermedades crónicas de creciente ocurrencia en la población (Marenjak, 2008). En referencia a los productos de origen animal como leche y carne, el estudio de ciertos componentes como los ácidos grasos (AG), especialmente los de cadena larga, ha sido objeto de mayor interés debido a su impacto sobre la salud de los consumidores. En este contexto, un reporte de la Universidad de Iowa indica que el “beneficio sobre la salud” fue señalado por los consumidores como el atributo más importante en la decisión de compra en un 36% para productos lácteos y un 42% para productos cárnicos, luego de la “frescura” y el “sabor” (Pirog et al., 2004). La creciente preocupación por la calidad de los productos de origen animal es función directa de las recomendaciones dadas a nivel mundial por los profesionales de la salud, quienes indican incrementar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados o PUFA (polyunsaturated fatty acids según sigla en inglés) y omega-3, reduciendo el consumo de grasas saturadas, grasas *trans* y colesterol (Daley et al., 2010).

Está ampliamente aceptado que el consumo de PUFA y conjugados del ácido linoleico o CLA (conjugated linoleic acid, según sigla en inglés) puede tener efectos positivos sobre la salud humana (Lawson et al., 2001), dado que han demostrado propiedades asociadas con efectos anticancerígenos, antiaterogénicos, antidiabéticos y antiadipogénicos (Parodi, 1999; Liu et al., 2002; Hamazaki et al., 2003; Drackley, 2004; Khanal y Olson, 2004; Lock y Bauman, 2004). Por este motivo, y tal como lo indican Nudda et al. (2014) en su revisión titulada “Feeding strategies to design the fatty acid profile of Sheep milk and cheese”, sigue resultando de interés el estudio de dietas que potencien la proporción de PUFA y CLA en leche y en carne. Esta interacción “dieta-producto final” tiene como eje central al rumen, siendo el principal responsable de la transformación de nutrientes en variables de calidad del producto. Es el rumen, en realidad, el órgano que provee de un medio adecuado a los verdaderos actores: los microorganismos.

Esta investigación profundiza en el estudio del metabolismo de los AG del alimento, la actividad del microbioma ruminal y su relación con la composición final de la leche.

1.2. Ácidos grasos: Clasificación y estructura.

Los AG son ácidos carboxílicos de cadena alifática hidrófoba, es decir su estructura básica consta de una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo terminal. Según el número de carbonos pueden dividirse en 4 grupos: volátiles (AGV), de 2 a 4; cadena corta, de 6 a 10; media, de 12 a 16 y larga (AGCL), de 16 en adelante. Los ácidos grasos pueden ser saturados (AGS) si poseen todos los átomos de carbono unidos por un enlace simple, mientras que los insaturados (AGI) presentan uno o más enlaces dobles (Drackley, 2004). Estos últimos pueden ser clasificados de acuerdo a la posición del primer doble enlace contando desde el grupo carboxilo o desde el grupo metilo terminal para la nomenclatura omega.

El sistema de referencia por grupo carboxilo indica el número de carbonos, de dobles enlaces y las posiciones de dichos dobles enlaces, contando desde el carbono del grupo carboxilo numerado como carbono 1 (similar al sistema de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada - IUPAC). Difiere de la IUPAC en que no utiliza nombres griegos para designar el largo de cadena, sino el número de carbonos. El sistema de referencia "omega" indica el número de carbonos, dobles enlaces y la posición del primer doble enlace contando desde el carbono omega o del grupo metilo terminal que es, en este caso, el carbono numerado 1 (Baggot y Dennis, 1995). Este sistema de clasificación basado en el carbono omega es muy utilizado en estudios de medicina humana y propiedades nutraceuticas ya que permite diferenciarlos por sus propiedades fisiológicas.

Los AGI pueden tener varios isómeros de naturaleza estructural, según la posición de los dobles enlaces, y de naturaleza espacial, según los hidrógenos unidos a los carbonos del doble enlace se encuentren del mismo lado (*cis*) o a ambos lados (*trans*) (Cuvelier et al., 2004; Mc Donald et al., 2006). Por otro lado, resultan mayoritarios en los lípidos de forrajes, cereales y oleaginosas. En forrajes, predominan los AGCL como el ácido α -linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3; ALN ó C18:3- ω 3) y ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2; AL ó C18:2- ω 6), representando más de 40% y más de 18% del total de AG, respectivamente (Palmquist, 1988).

1.3. Metabolismo de los AG en rumiantes.

Los lípidos de los forrajes, principalmente triglicéridos y glicolípidos, sufren dos transformaciones en el rumen. En una primera instancia, la hidrólisis de los lípidos o lipólisis, proceso que es llevado a cabo por la actividad de lipasas microbianas extracelulares, destacándose *Anaerovibrio lipolytica* por su alta actividad lipolítica (Jenkins, 1993). Se hidrolizan los enlaces éster y se separan los AG y los azúcares del glicerol. Hespell y O'Bryan-Shah (1988) observaron un amplio rango de bacterias con actividad esterasa, pero pocas con capacidad para hidrolizar los AGCL. Los azúcares y el glicerol son rápidamente fermentados rindiendo, principalmente, ácido propiónico, precursor de la glucosa en el hígado. Los AG entran en la segunda etapa de la digestión ruminal: la biohidrogenación (BH). Tal como indican Kim et al. (2009), es fundamental el establecimiento de grupos carboxilos libres para que pueda darse la misma.

El proceso de BH consiste en la saturación de las dobles ligaduras presentes en los AGI (Scollan et al., 2003; Drackley, 2004; Martínez Marín et al., 2010). Los sustratos principales para este proceso son el AL y el ALN (Doreau y Ferlay, 1994). Si bien fue descripta la capacidad de hidrogenar varios isómeros posicionales (Kemp y Lander, 1984), el modelo de mayor interés es la BH del AL (Palmquist, 1996). La BH del AL

comienza por una isomerización del doble enlace *cis-12* a *trans-11*, obteniéndose como resultado el *cis-9, trans-11* CLA o ácido ruménico, nombre propuesto por Kramer et al. (1998) para referirse al isómero mayoritario del AL hallado en productos naturales derivados de rumiantes (Chin et al., 1992; Mc Guire et al., 1997).

El *cis-9, trans-11* CLA representa un compuesto sumamente interesante no sólo para la ciencia de la nutrición sino también para diversas disciplinas dentro de la medicina. Las propiedades anticancerígenas fueron primero identificadas en la fase de iniciación del modelo de cáncer de piel en ratón (Ha et al., 1987), demostrándose con sucesivas investigaciones sus efectos anticarcinogénicos, inhibiendo varios modelos de cáncer en animales experimentales, como tumores mamarios y neoplasias en los pre-stómagos (Ha et al., 1990; Ip et al., 1991; Liu et al., 2002).

Park explica en el capítulo “CLA and Cancer” del libro “Nutrition and Cancer” (Awad y Braford, 2005) varios eventos con los que se ha relacionado este compuesto, como la posible implicancia en la reducción de las metástasis o desarrollo de tumores secundarios en cáncer de mama. Otro ejemplo, es su efecto sobre la abundancia y actividad de la protein-kinasa C en las membranas celulares en cáncer de próstata para producir un perfil apoptótico de las células malignas. Finaliza la revisión destacando que el CLA induce la apoptosis tanto en células de cáncer de mama como en hígado, colon, tejido adiposo, entre otros.

A partir del 2000, la investigación en CLA ha avanzado, principalmente, sobre el incremento en la resistencia a la insulina y la inducción de procesos de peroxidación lipídica (Riserus 2004). Otras líneas fuertes de trabajo incluyen la inhibición del *cis-9, tras-11* CLA sobre el desarrollo y proliferación de líneas celulares del adenocarcinoma gástrico por bloqueo del ciclo celular (Liu et al., 2002). Wong et al. (2015) han demostrado efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular del osteosarcoma en caninos por otro isómero CLA, el *tras-10, cis-12* CLA, quienes sugieren a futuro la generación de suplementos dietarios de CLA para la prevención de este tipo de cáncer tan agresivo en humanos.

En una reciente revisión sobre el consumo de CLA y el riesgo de cáncer de mama se ha puesto en discusión la efectividad de este compuesto dadas las inconsistencias en los resultados encontrados (Arab et al., 2016). Sin embargo, los investigadores reconocen la dificultad de aislar en humanos “el efecto CLA” de otros factores como la gordura, actividad física, otros agentes de la dieta, la predisposición genética, etc. Lo que puede resultar controversial en estudios en humanos, resulta un hecho innegable en experimentos con modelos animales bajo factores controlados, como lo demuestran las experiencias antes citadas. Si bien existen 8 potenciales isómeros del CLA, tanto posicionales (9/11 o 10/12 dobles ligaduras) como geométricos (varias combinaciones), el *cis-9, trans-11* y *trans-9, cis-11* son los más activos como antioxidantes y anticarcinogénicos (Liu et al., 2002). Otro isómero CLA que discutiremos más adelante y es de especial interés en nutrición de rumiantes, es el *trans-10, cis-12*.

Retomando el proceso de BH, la segunda reacción consiste en una reducción en la cual el enlace *cis-9, trans-11* CLA es convertido a *trans-11* o ac. vaccénico (Jenkins et al., 2008).

Al igual que el AL, la BH del ALN comienza por la isomerización del *cis-12* a *trans-11*, resultando en *cis-9, trans-11, cis-15* C18. Este proceso es rápidamente seguido por la reducción de los enlaces *cis-9* y *cis-15* hasta formarse ac. vaccénico (*trans-11* C18:1). A diferencia de la BH del AL, en este caso no se forma ac. ruménico como intermediario (Bauman et al., 1999; Chilliard, 2004; Jenkins et al., 2008; Kim et al, 2009). Doreau y Ferlay (1994) hallaron que la eficiencia de BH del AL y el ALN osciló entre 70-95% y 85-100%, respectivamente. Usualmente, el AL es biohidrogenado de forma

incompleta, resultando en distintos AG monoinsaturados, de los cuales el vaccénico es el predominante y, por otro lado, se forman también conjugados del AL, siendo el *cis-9, trans-11* el isómero dominante.

El último paso de la BH es la reducción del ácido vaccénico a esteárico (C18:0). No obstante, la velocidad de esta reacción es más lenta que los pasos anteriores, por lo que comienza a acumularse y limita la tasa de BH. De este modo, el flujo digestivo que sale del rumen contiene principalmente *trans-11* C18:1 y *cis-9, trans-11*, C18:2 y una baja proporción de C18:0, en lugar de C18:2 y C18:3. Estos productos de la BH que abandonan el rumen, son absorbidos en el intestino delgado, y transportados vía sistema porta al hígado, el cual “decide” sus destinos metabólicos: tejido adiposo y glándula mamaria.

En dichos tejidos el *trans-11* C18:1 puede ser desaturado a *cis-9, trans-11* CLA a través del complejo enzimático desaturasa. La Δ^9 -desaturasa es la enzima más importante y su actividad se basa en introducir una doble ligadura *cis* entre el carbono 9 y el 10. Chilliard et al. (2007) reportaron en un estudio con vacas lecheras que del flujo duodenal de *trans-11* C18:1, el *cis-9, trans-11* CLA representaba un 32% con un r^2 de 0,89 en la relación *trans-11* y *cis-9, trans-11* CLA en leche. Esto indicaba que alrededor de un 90% de los CLA de la leche eran producto de la desaturación del vaccénico.

El tejido adiposo es el sitio de mayor producción de *cis-9, trans-11* CLA en animales en crecimiento, en cambio, en animales en lactación, corresponde a la glándula mamaria (Bickerstaffe y Annison, 1970; Kinsella, 1972, citados por Jenkins, 1993). Son estas transformaciones que sufren los AG en los tejidos las que determinan a la leche y la carne provenientes de rumiantes como principales fuentes de AGPI (principalmente CLA) en las dietas occidentales (Khanal y Olson, 2004; Schroeder et al., 2004).

1.4. El rol de la dieta sobre el metabolismo de los AG.

En rumiantes, las características de la dieta inciden sobre el metabolismo de los PUFA tanto a nivel ruminal como en la glándula mamaria (Chilliard et al., 2007), lo cual repercute en el perfil de AG de la leche. Los PUFA provenientes del alimento son biohidrogenados en el rumen, produciendo diversos intermediarios e isómeros según el tipo de dieta (Grinari et al., 1998; Grinari y Bauman, 1999; Sauvant et al., 2000; Loor et al., 2003). En este contexto, dietas a base de forraje producen, en general, leche con mayores contenidos de AGCL (Dhiman et al., 1999a; Dewhurst et al., 2003d; Elgersma et al., 2004; Khanal y Olsen, 2004), predominando en la grasa láctea los PUFA y los isómeros *trans-11*, C18:1 y *cis-9, trans-11* C18:2 CLA. Dado que las producciones individuales pueden verse limitadas en dietas pastoriles, la suplementación se ha convertido en una estrategia habitual para incrementar la producción de leche (Kempton, 1983; Stockdale et al., 2000; Bargo et al., 2003; Bargo et al., 2006; Vázquez et al., 2006).

La incorporación de suplementos energéticos induce cambios en el medio ambiente ruminal y, en consecuencia, en el proceso de BH, generando mayor proporción de isómeros *trans-10*, C18:1 y del *trans-10, cis-12* C18:2. De este modo, la producción de intermediarios de la BH de los PUFA de la dieta puede variar ampliamente, generando distintos perfiles de AGCL tanto en el rumen como en la leche.

Se han reportado numerosos trabajos sobre el metabolismo ruminal de los AGCL en dietas a base de forraje puro (Bauchard et al., 1984; Kalscheur et al., 1997; Chilliard y Ferley, 2004; Elgersma et al., 2004; Shingfield et al., 2005; Kalač y Samkova, 2010; Blasco et al., 2011) o suplementadas con concentrados almidonosos o con grasas y aceites (Dhiman et al., 1999; Chilliard et al., 2001; Loor et al., 2003; Loor et al., 2004; Schroeder et al., 2004; Loor et al., 2005a,b; Brown et al., 2008; Chilliard et al., 2009). Sin embargo, existe escasa información respecto del efecto de la suplementación con

concentrados energéticos ricos en el aporte de carbohidratos estructurales sobre la eficiencia del proceso de BH y el impacto generado sobre las comunidades microbianas del rumen.

Por otro lado, Bocquier y Caja (1993) señalaron que los efectos de la nutrición sobre la producción y composición química de la leche eran parcialmente conocidos en ovejas y cabras, en comparación con los estudios en vacas, pero los resultados pueden no ser extrapolables.

1.5. Hipótesis general.

La suplementación de dietas pastoriles con concentrados energéticos modifica el microbioma ruminal y altera la biohidrogenación, lo que cambia el perfil de ácidos grasos tanto en el rumen como en la leche de los ovinos. Suplementos fibrosos promoverían la acumulación de isómeros *trans-11* en rumen, generando mayor contenido de PUFA y CLA en leche. Por el contrario, suplementos almidonosos conducen a la aparición de isómeros *trans-10*, vinculados al síndrome de baja grasa en leche.

1.6. Objetivo general

Estudiar los cambios inducidos por la suplementación con diferentes tipos de concentrados energéticos, sobre la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos de cadena larga, las poblaciones microbianas del rumen y la calidad de la leche de ovejas en un sistema de base pastoril.

CAPÍTULO 2.

Efecto de la fuente de energía suplementada sobre la producción, composición química y perfil de ácidos grasos de la leche.

2.1. Introducción.

Tal como fue mencionado en el capítulo anterior, vacas alimentadas a base de forrajes producen leche con mayor contenido de AGCL poliinsaturados (Dhiman et al., 1999a; Dewhurst et al., 2003d; Elgersma et al., 2004; Khanal y Olsen, 2004). Del mismo modo, en ovinos se ha observado una mejora en la composición de AG con el incremento de la disponibilidad y el consumo de forraje (Nudda et al., 2003; de Renobales et al., 2012).

Sin embargo, en los sistemas pastoriles puede verse limitado el potencial de producción por limitantes sobre el consumo. Este factor nutricional ha sido señalado como el de mayor incidencia sobre la respuesta productiva. Campling et al. (1963)

señalaron que más del 65% de las variaciones en la productividad eran explicadas por variaciones en el consumo de materia seca (CMS). Del mismo modo, Forbes (1986) refuerza este concepto al indicar que cuando el consumo se halla limitado, la producción puede ser pobre y la eficiencia de conversión baja. El CMS limita el nivel productivo ya que opera como el principal factor responsable del consumo total de energía (Kolver y Muller, 1998). De acuerdo con diversos autores (Kempton, 1983; Stockdale et al., 2000; Bargo, 2003; Bargo et al., 2006; Vázquez et al., 2006) es posible aumentar el consumo de energía y mejorar la respuesta en performance lechera a través de la suplementación con concentrados energéticos.

Shaver (2012) pone de manifiesto la importancia del grano de maíz como el principal suplemento energético utilizado en lechería, dado su elevado contenido de almidón, el cual representa el 75% del valor energético final del grano (NRC, 2001). En consistencia con Shaver (2012), Akins et al. (2012a, b) y Allen (2012) indican también que el almidón representa un carbohidrato muy importante en la ración de vacas lecheras, no obstante, existen numerosas fuentes suplementarias de carbohidratos que pueden utilizarse en reemplazo del maíz. Los altos costos del grano condujeron, entonces, a cambios en la formulación de raciones en pos de una mayor utilización de forrajes de alta calidad, subproductos con FDN altamente digestible y carbohidratos no fibrosos (Chase, 2007; Knapp, 2007; Staples, 2007 y Shaver, 2008 citados por Dann, 2010). Dann (2010) agrupa a estas fuentes alternativas como “fuentes fibrosas no provenientes de forrajes” o NFFS (non forage fiber sources, según sigla en inglés) e indica que es posible utilizarlas en reemplazo del maíz, bajando el contenido de almidón de la dieta pero sin afectar la performance lechera.

Una de las alternativas que ha recibido notable atención en los últimos años, es la sustitución de granos por fuentes de carbohidratos estructurales o fibrosos como las cascarillas de soja (Ipharraguerre et al., 2002). La cascarilla de soja representa un subproducto con potencial para suplementar energía en dietas a base de forrajes a través del aporte de carbohidratos fibrosos de alta degradabilidad (Hein, 2009). En producción lechera, este aspecto cobra fundamental importancia ya que de acuerdo con Blasi et al. (2000) es posible reemplazar parcialmente al maíz y aún así obtener buenos niveles de energía y fibra digestible. Esto genera, al mismo tiempo, un ambiente ruminal más favorable para la degradación de la fibra, que tiene incidencia directa sobre la producción y el % de grasa de la leche. La cascarilla de soja ha sido incorporada exitosamente hace varios años en programas de suplementación sobre forrajes de alta calidad, tanto en producción bovina de carne (Cravey et al., 1993) como de leche (Bernard and McNeill, 1991; Coomer et al., 1993).

Resultados más recientes en rumiantes menores fueron obtenidos por Zenou y Miron (2005), quienes indican mayores CMS y consumos de FDN en ovejas lecheras suplementadas con cascarilla de soja en comparación con las suplementadas con maíz. Similarmente, Zambon et al. (2012) en cabras en lactancia temprana, reportaron mayor digestibilidad y CMS en favor de la cascarilla de soja respecto del maíz molido para una dieta base con 40% silaje de maíz. En adición a las mejoras en CMS y consumo de fibra, numerosos estudios muestran incrementos en la producción de leche y en el porcentaje de grasa butirosa al reemplazar el grano de maíz por suplementos fibrosos como la cascarilla (Cavani et al., 1990; Cannas et al., 1998; Zenou y Miron, 2005; Cannas et al., 2013), aspecto señalado por Nudda et al. (2014) como la habilidad de los suplementos con elevada fibra digestible para estimular la síntesis de grasa de la leche.

De acuerdo con Jiang et al. (1996), a través de la manipulación de la dieta, no sólo es posible lograr mejoras en performance animal, sino que también se puede mejorar la calidad del producto final, incrementando, por ejemplo, el nivel de CLA en leche. Dietas

altas en concentrados almidonosos resultarían en altas concentraciones de isómeros *trans-10* en leche en contraste con dietas con elevado nivel de fibra, caracterizadas por mayor producción de isómeros *trans-11*, mayor nivel de *cis-9*, *trans-11* CLA y C18:3 (Chilliard et al 2007). Stockdale et al. (2003) y posteriormente Bargo et al. (2006) hallaron fuertes correlaciones entre el CMS de forraje y la concentración de *cis-9*, *trans-11* CLA en leche.

La suplementación energética tiene además un efecto directo sobre el ambiente del rumen y la actividad metabólica de sus microorganismos. Estos aspectos serán ampliamente discutidos en los capítulos siguientes ya que representan factores de gran incidencia sobre el nivel de grasa en leche y el perfil de AG de la misma a través de los intermediarios generados en el proceso de BH.

Presumiblemente, el consumo de cascarilla de soja como suplemento de fibra altamente fermentecible genera un medio ruminal similar al de dietas basadas en forraje como único alimento y promueve la mayor producción de isómeros *trans-11* y *cis-9*, *trans-11* CLA en leche. El presente experimento tuvo por objeto evaluar el efecto de dos suplementos contrastantes en el aporte de carbohidratos (cascarilla de soja vs. grano de maíz) sobre el CMS, la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS), la producción de leche (PL), la composición y perfil de AG de la leche de ovejas lecheras sobre una dieta base de raigrás (*Lolium multiflorum* L.) fresco.

2.2. Materiales y métodos:

El experimento fue llevado a cabo en el tambo experimental ovino ubicado en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA). Una pastura de raigrás anual (*Lolium multiflorum* L) fue utilizada durante la etapa experimental para proveer forraje fresco que fue cortado diariamente y suministrado en comedero.

2.2.1. Animales y diseño experimental:

Todos los procedimientos que involucraron el manejo de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Departamento de Producción Animal, FAUBA.

Diez ovejas lecheras (30 días en leche, DEL; $65,8 \pm 8,67$ kg de peso vivo, PV) fueron alojadas en corrales individuales con libre acceso al agua de bebida y distribuidas en dos grupos de 5 animales cada uno, balanceados por condición corporal (CC). Las ovejas fueron asignadas a dos tratamientos, en un diseño completamente aleatorizado con medidas repetidas en el tiempo: CS (Cascarilla de soja) y MZ (grano de maíz). Los tiempos de muestreo fueron tres, con 14 días previos de adaptación a la dieta y 7 días consecutivos de muestreo cada uno de esos tiempos. La duración total del experimento fue de 35 días (14+21) en un diseño continuo.

Las dietas se formularon en base seca (bs) según NRC (1985) y fueron balanceadas con expeller de soja de modo que resulten isonitrogenadas (16% PB bs). El raigrás anual se cortaba al mediodía y se ofrecía fresco en comederos individuales, separados del suplemento. El suplemento, integrado por el concentrado energético más el expeller de soja y suplemento vitamínico-mineral (correctamente mezclados) fueron suministrados media hora después del forraje fresco. La ración total diaria se ofreció al 4% del PV, en una relación forraje: concentrado de 50:50 en bs. El PV fue registrado al inicio de cada tiempo de muestreo (3 tiempos de 7 días cada uno) y la CC fue evaluada en una escala de 1 a 5, con puntos intermedios cada medio punto, al mismo momento de pesaje de los animales (Russel et al., 1969).

2.2.2. Muestreos y análisis.

Composición química de los alimentos.

Todos los ingredientes de la ración (concentrados y forrajes) se muestrearon diariamente y luego se constituyó un pool de muestras por cada tiempo de muestreo (3). Estas muestras compuestas fueron analizadas por MS, a través del secado en estufa de aire forzado a 105°C durante 4h (AOAC, 2000). Para los análisis de composición química todas las muestras fueron secadas en estufa de aire forzado a 65°C durante 48 h y luego molidas a un tamaño de malla de 1mm utilizando un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA). Las muestras de forrajes, concentrados y heces fueron analizadas para proteína bruta (PB), extracto etéreo (EE), y fracciones analíticas de la fibra (FDN, FDA y LDA). Para el análisis de AG, las muestras de forraje fueron inmediatamente almacenadas en freezer a -20°C y secadas por liofilización. Para los análisis de los concentrados se utilizó una muestra pool de los tres tiempos de muestreo (Cuadro 1 y 2). En cambio, para los análisis del raigrás, se utilizó una muestra pool por cada tiempo (Cuadro 3 y 4).

Técnicas de referencia:

- Fibra en detergente neutro, fibra en detergente ácido y lignina en detergente ácido (FDN, FDA y LDA): por el método secuencial, con α -amilasa y sin sulfito de sodio, acorde al procedimiento descrito por Van Soest et al. (1991) en un baño procesador (Ankom Technology Corp., Fairpoint, NY, USA).
- Proteína bruta (PB): por técnica micro Kjeldahl transformando el N obtenido en PB mediante el factor 6,25 (AOAC, 1990).
- Extracto etéreo (EE): extractor Soxhlet, con hexano (AOAC, 1992).
- Cenizas: Por combustión total en mufla (AOAC, 2000).
- Ácidos grasos (AG) en forrajes y concentrados: análisis por cromatografía gaseosa, utilizando el procedimiento de metilación en un paso descrito por Sukhija y Palmquist (1988).

Cuadro 1. Composición química de los alimentos que integran el suplemento (pool de tres tiempos de muestreos).

	Cascarilla de soja	Grano de maíz	Expeller de soja
MS (g/Kg)	936,9	929,45	945,51
MO (g/Kg)	753,22	905,18	880,27
PB (g/Kg)	163,05	115,15	415,86
FDN (g/kg MS)	434,60	51,20	133,50
FDA (g/kg MS)	327,90	25,62	70,11
EE (g/kg MS)	23,23	75,71	143,11

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; EE: extracto etéreo.

Cuadro 2. Perfil de ácidos grasos de los alimentos que integran el suplemento (pool de tres tiempos de muestreo).

FAMES (g/100g) ¹	Cascarilla de soja	Grano de maíz	Expeller de soja
16:0	12,22	11,95	12,02
16:1 C9	Nd	Nd	0,08
18:0	4,73	2,08	4,32
18:1 C9	18,21	31,29	17,68
18:2 n6	53,98	45,26	53,15
20:0	Nd	0,57	0,30
18:3 n3	7,30	1,24	7,44

¹ FAME: Fatty acid methyl ester.

Cuadro 3. Composición química de raigrás fresco en los distintos tiempos de muestreo (I, II y III) (pool por tiempo).

	I	II	III
MS (g/Kg)	164,3	203,61	223,12
MO (g/Kg)	783,87	765,99	805,25
PB (g/Kg MS)	192,48	181,92	180,73
FDN (g/kg MS)	534,1	437,1	480,1
FDA (g/kg MS)	276,71	242,86	242,61
LDA (g/kg MS)	48,44	39,37	24,14
EE (g/kg MS)	39,79	49,23	42,01

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; LDA: lignina insoluble en detergente ácido; EE: extracto etéreo.

Cuadro 4. Perfil de ácidos grasos de raigrás fresco en los distintos tiempos de muestreo (I, II y III) (pool por tiempo).

µg ¹ FAMES/ kg MS raigrás	I	II	III
12:0	1,01	0,56	0,79
14:0	0,78	0,60	0,68
15:0	0,26	0,29	0,16
i16:0	6,79	5,49	6,61
16:0	20,68	19,79	23,10
16:1 c7	2,43	2,42	2,55
16:1 c9	0,49	0,86	1,03
17:0	0,32	0,35	0,26
17:1 c10	1,94	2,46	1,79
18:0	1,59	2,52	2,14
18:1 n9	5,84	8,68	10,87
18:2 n6	8,36	7,93	12,05
20:0	0,84	0,79	0,58

18:3 n3	25,17	17,94	29,58
20:3 n3	1,43	1,21	1,24
24:0	0,71	1,00	1,74
24:1 n9	0,12	0,72	0,74

¹ FAME: Fatty acid methyl ester.

Consumo y digestibilidad.

El CMS fue calculado diariamente como la diferencia entre Kg de alimento ofrecido y kg de alimento rechazado, corregidos por el valor diario de materia seca.

La evaluación de digestibilidad se realizó durante el tercer periodo de muestreo, mediante el método *in vivo* (DMS), utilizando arneses de digestibilidad, que permitían filtrar la orina y coleccionar correctamente sólo las heces. Los arneses se vaciaban dos veces por día y las excretas se pesaban en fresco al final del día. Se tomó una submuestra del 10% para la corrección por MS y posterior análisis químico.

Producción y composición química de la leche.

La producción individual de leche (g.d⁻¹) fue calculada como la suma de la producción de los dos ordeños, a las 08:00 y 16:00, respectivamente. Se colectaron diariamente muestras de leche en tubos Falcon de 50ml en cada uno de los ordeños y luego se formaron dos muestras compuestas por animal por cada tiempo de muestreo. Una de las mismas fue almacenada a 4°C con bronopol como conservante para el posterior análisis de grasa, proteína y sólidos totales con tecnología MilkoScan (INTI). La otra muestra fue almacenada a -20°C para el posterior análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

Análisis de ácidos grasos en leche.

Para el análisis de AG en leche, se tomaron 25mg de grasa y fue transformada en ácidos grasos metil-esters (FAME) por medio de la metanolisis básica de los glicéridos con KOH en metanol de acuerdo con procedimiento ISO-IDF (ISO –IDF, 2002). Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo Varian, modelo CP3800 equipado con detector FID, con columna capilar CP-Sil 88(100m*0.25mm*0.20µm of Varian CP7489). La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C. El gas carrier utilizado fue el helio, mantenido a un flujo constante de 1.0 mL/min. Se inyectó 1 µl de muestra con un split de 1:100. La temperatura de la columna se mantuvo en 45°C durante 4 min, luego se incrementó desde 45 a 165°C a una tasa de 13°C/min y fue mantenida durante 35 min; finalmente se incrementó desde 165 a 215°C a una tasa de 4°C/min, mantenida durante 30 min. El tiempo total de la corrida fue de 90 min.

Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención relativa con los estándares individuales de ácidos grasos (PUFA-2 Animal Source, Grain Fatty acid Methyl Ester Mix, Octadecadienoic acid, conjugated, methyl ester, trans-11-Vaccenic Methyl Ester, cis-11-Vaccenic Methyl Ester, trans-9-Elaidic Methyl Ester and 37-Component FAME mix, Sigma-Aldrich, USA). Los resultados analíticos fueron expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

Los índices de ácidos grasos fueron calculados de la siguiente manera:

- **Índice $\Delta 9$ –desaturasa:**

$[C14:1 / (C14:0 + C14:1)]$, de acuerdo con Lock y Garnsworthy (2003), citados por Palladino et al. (2009).

- **Índice de aterogenicidad:**

$(C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / (MUFA + PUFA)$, según Chilliard et al. (2003).

Técnicas de referencia:

- Milk fat-Preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182:2002. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization/International Dairy Federation.
- Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography. International Standard ISO 15885-IDF. Switzerland: International Standardization Organization/International Dairy Federation.
- Use of an extremely polar 100-m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles. Miguel Ángel de la Fuente, Valle Rodríguez-Pino, Manuela Juárez. International Dairy Journal 47 (2015) 52-63.

2.2.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SAS (SAS Institute, 2008). Los resultados fueron analizados como un diseño completamente aleatorizado utilizando el procedimiento mixto, donde el animal fue incluido como efecto aleatorio. Las medias fueron comparadas mediante test de Tukey ($\alpha = 0,05$). La ecuación del modelo se describe como:

$$Y_{ij} = \mu + \text{trati} + \text{tiempo}_j + \text{trati} \times \text{tiempo}_j + \text{Error}_{ij}$$

donde: μ es la media general, **trati** es el efecto del tratamiento (MZ y CS), **tiempo_j** representa el tiempo de muestreo, **trati x tiempo_j** es la interacción, y **Error_{ij}** es el error experimental. Las diferencias fueron declaradas con $P < 0,05$ y las tendencias se discutieron cuando $P < 0,10$.

2.3. Resultados y discusión.

2.3.1. Consumo y digestibilidad.

De acuerdo con los resultados reportados en el Cuadro 5, se detectaron diferencias en CMS y DMS entre dietas ($P < 0,05$). Las ovejas alimentadas con CS presentaron mayor CMS respecto de las que recibieron MZ, debido al mayor consumo de forraje ($P < 0,05$) dado que no hubo diferencias en el consumo de suplemento entre tratamientos (resultados no reportados en el cuadro).

Mac Gregor et al. (1976) sugirieron que el tamaño de partícula de la cascarilla de soja facilita una mayor tasa de pasaje a través del retículo-rumen, permitiendo un incremento en el consumo. Por otro lado, está ampliamente aceptado que el contenido de fibra medida como FDN se halla negativamente correlacionado con el consumo (Waldo, 1986; Jung and Allen, 1995; Allen, 2000; Arelovich et al., 2008; Harper and Mc Neill, 2015) debido al efecto de llenado causado por una lenta fermentación y, por ende, alto tiempo de permanencia en el rumen (Zambon et al., 2012).

Tal como lo expuesto en el Cuadro 1, la dieta CS contiene mayor contenido de FDN, lo cual nos conduciría a esperar menores CMS totales por efecto de regulación física. Sin embargo, en una extensa revisión publicada por Ipharraguerre y Clark (2003)

sobre el uso de cascarilla en dietas de lechería, se reportó que no existía correlación entre el CMS y la concentración de FDN para dietas conteniendo CS. Es importante considerar que la FDN de la cascarilla de soja ha sido indicada como fibra de alta fermentabilidad (Hein, 2009) y, como tal, incrementa la tasa de pasaje y, en consecuencia, el consumo (Robinson y McQueen, 1997). Es por esto que es la composición química de la FDN más que el contenido de FDN en sí misma, la que explica el mayor consumo en la dieta CS vs. la dieta MZ.

Cuadro 5. Efecto de la fuente energética suplementada sobre la performance animal.

Variable	Tratamiento ¹		EEM ²	Significancia ³		
	MZ	CS		T	P	TxP
Consumo de MS total (g.kg ⁻¹ PV ^{0.75})	89,2 ^b	98,9 ^a	2,92	*	**	NS
Consumo de MS de forraje (g.d ⁻¹)	1015 ^b	1181 ^a	35,0	**	**	NS
Digestibilidad de la MS (g.kg ⁻¹ MS) ⁵	814,5 ^a	746,3 ^b	14,45	*	-	-
Digestibilidad de la FDN (g.kg ⁻¹ FDN) ⁵	723,2	742,7	14,97	NS	-	-
Digestibilidad de la FDA (g.kg ⁻¹ FDA) ⁵	560,9 ^b	723,5 ^a	41,29	*	-	-
Peso Vivo (kg)	64,9	65,73	2,22	NS	NS	NS
Condición Corporal	2,42	2,6	0,1	NS	NS	NS
Producción de leche (g.d ⁻¹)	1290	1601	180,4	NS	NS	NS
Proteína (g.kg ⁻¹ leche)	50,6	50,0	1,81	NS	NS	NS
Grasa (g.kg ⁻¹ leche)	65,3	73,7	4,68	NS	NS	NS
Eficiencia de conversión (g leche.kg ⁻¹ CMS)	667	674,6	58,59	NS	**	NS

^{a-b} Superíndices en una misma fila indican diferencias entre medias.

¹MZ= grano de maíz; CS = cascarilla de soja; ²Error estándar de la media ³T=tratamiento; P=periodo; TxP=interaccion * P < 0,05; ** = P < 0,01; NS = no significativo.

Bernard y Mc Neil (1991) evaluaron la respuesta productiva y la digestibilidad en vacas lecheras alimentadas con dietas a base de silaje de maíz conteniendo distintos suplementos energéticos con alto contenido de fibra en reemplazo parcial del grano de maíz como fuente de energía. Observaron mayor CMS en el grupo que recibió CS en comparación con afrechillo de trigo, no existiendo diferencias con los animales que consumieron gluten feed y la dieta control con grano de maíz. Tal como lo esperado y, de acuerdo a la mayor concentración de fibra del tratamiento CS, los consumos de FDN y FDA también resultaron significativamente mayores en la dieta con cascarilla ($P < 0.01$).

En un trabajo más reciente conducido por Zenou y Miron (2005) sobre ovejas lecheras, se evaluó la performance productiva a través de la inclusión de CS como sustituto del MZ a una dieta conteniendo 25% de heno, 10% de silaje de trigo y 65% de suplemento peletizado, el cual contenía un 51% de CS como reemplazo del MZ. También obtuvieron mayores CMS y de FDN en el grupo de animales que consumió pellets con CS como fuente de energía en comparación con ovejas del grupo MZ que recibieron pellets con alto contenido de almidón. Ipharraguerre et al. (2002) reportaron una tendencia en el decrecimiento lineal del CMS en vacas lecheras en lactancia media conforme se incrementaba el porcentaje de inclusión de CS en reemplazo del MZ sobre una dieta a base de silaje de alfalfa, obteniéndose los CMS más bajos al 30 y 40% de inclusión de CS. A diferencia de dicho estudio, para un nivel de inclusión similar, del

50% de CS, se observó mayor CMS en comparación con la dieta MZ. De igual forma, Broderick et al. (2002), para la misma dieta base del estudio de Ipharraguerre et al. (2002) (silaje de alfalfa), encontraron menores CMS cuando reemplazaron parcialmente el grano de maíz por pulpa de citrus, otra fuente de carbohidratos fibrosos de alta degradabilidad, en una relación de 50:50 en el suplemento, acompañada esta reducción en el consumo por menor rendimiento de leche.

En referencia a la digestibilidad, el suplemento energético tuvo un efecto altamente significativo sobre la DMS, la cual resultó superior en el tratamiento MZ ($P < 0,05$). Esto es contrario a lo observado por Zervas et al. (1998) quienes obtuvieron mayores DMS en ovejas suplementadas con CS como fuente energética alternativa del MZ, en una dieta 40:60 heno:concentrado. En el experimento de Bernard y Mc Neil (1991) mencionado anteriormente, no se observaron diferencias significativas entre CS y MZ para la DMS aunque sí se obtuvieron diferencias para la digestibilidad de las fracciones fibrosas en favor del tratamiento CS, en una dieta base de silaje de maíz. Más recientemente, en un ensayo sobre cabras en lactancia temprana, Zambon et al. (2012) concluyeron que la cascarilla posee mayor DMS respecto del maíz molido (63% vs 54%) evaluando su reemplazo en una dieta base de 40% silaje de maíz.

En nuestro estudio, la digestibilidad de la FDN no fue afectada por el suplemento energético, sugiriendo que la digestibilidad de la fibra de la dieta de cascarilla es comparable con la dieta de maíz, aún encontrando mayores contenidos de fibra en la dieta CS (Cuadro 1). Por el contrario, la digestibilidad de la FDA fue afectada por la dieta, siendo de 723,5 g/kg MS y 560,9 g/kg MS para CS y MZ, respectivamente ($P < 0,05$). Esto se halla en consistencia con ensayos previos en vacas lecheras, los cuales reportan incrementos en la digestibilidad de la FDA en dietas conteniendo CS en reemplazo de los granos (Mac Gregor, 1976; Highfill, 1987; Bernard, 1988). Los resultados contradictorios encontrados en la DMS podrían sugerir efectos asociativos entre el forraje y el suplemento energético.

Dixon y Stockdale (1999) indicaron que las interacciones forraje-grano en dietas mixtas, también conocidas como “efectos asociativos” se deben, principalmente, a cambios en el consumo y/o en digestibilidad, con mayores efectos sobre el consumo de forraje (expresado como efecto de sustitución) que sobre la digestión de la fibra. El efecto de sustitución se explica, en términos simples, a través de un menor consumo de forraje debido al reemplazo por el consumo de suplemento. Esto podría explicar porqué, en el presente trabajo, se obtuvieron mayores CMS y consumo de forraje en el tratamiento CS en comparación con MZ ($P < 0,05$), aún sin efecto sobre la digestibilidad de la FDN entre dietas. Los resultados observados sobre el consumo radicarían, posiblemente, en el efecto de sustitución para la dieta MZ por un lado y, por otro, en la alta tasa de pasaje de la cascarilla de soja sumado a un ambiente ruminal más próximo al de dietas de 100% forraje en comparación con dietas mixtas con grano (Anderson et al., 1988a) para la dieta CS. Esto último puede verse reflejado, especialmente, en mayores niveles de pH ruminal obtenidos en el tratamiento CS en comparación con MZ (ver capítulo 3). Si evaluamos la interacción forraje-grano a partir de cambios en la digestibilidad, podríamos deducir que la DMS no sólo dependería del tipo de concentrado utilizado en la dieta sino que también del forraje base. Al parecer, cuando la calidad del forraje es alta, como la pastura de raigrás del presente estudio, el uso de CS como fuente de energía en una relación de 50:50 forraje:suplemento, resulta en menores digestibilidades de la dieta total, aún cuando el suplemento es una fuente de fibra de alta degradabilidad. Por otro lado, cuando el forraje base es de calidad intermedia a baja, como el heno en el estudio de Zervas et al. (1998) y el silaje de maíz en los experimentos de Bernard y Mc Neil (1991) y Zambon et al. (2012), la DMS se incrementa al utilizar cascarilla de soja, probablemente debido a un efecto

asociativo positivo sobre la degradación de la fibra del forraje base. Queda claro que las respuestas en consumo y digestibilidad son el resultado de una fuerte interacción entre el forraje base de la dieta y el tipo de concentrado utilizado.

Hein (2009) señaló que las mejoras en performance productiva obtenidas con la inclusión de cascarilla de soja eran usualmente atribuidas a la mayor digestibilidad total de la dieta en comparación con dietas de heno únicamente, lo cual se acompañaba, al mismo tiempo, por incrementos en el consumo.

2.3.2. Producción y calidad de leche.

No se detectaron diferencias entre tratamientos para las variables PL, composición química de la misma y eficiencia de conversión ($P > 0,05$; Cuadro 5). Si bien estos resultados son consistentes con algunos estudios en vacas lecheras, en los cuales los suplementos almidonosos fueron reemplazados por suplementos de alto contenido de fibra (Mac Gregor et al., 1976; Nakamura y Owen, 1989; Bernard y Mc Neill, 1991; Dan et al., 2008), existen evidencias que muestran resultados contradictorios. Ipharraguerre et al. (2002) indicaron que la producción de leche tuvo una tendencia a decrecer con un porcentaje de inclusión de CS del 40%, no obstante la concentración de grasa de la leche se incrementó linealmente a mayores porcentajes de inclusión de CS y menores contenidos de almidón en el suplemento. Por otro lado, Voelker y Allen (2003c) reportaron que no hubo efecto del incremento de la pulpa de citrus en la dieta, suplemento fibroso rico en pectinas, sobre el rendimiento de leche pero sí hubo un incremento cuadrático sobre el rendimiento de grasa.

Otros estudios en pequeños rumiantes, como el de Gentil et al., (2011) en ovejas lecheras, no hallaron diferencias en la PL y porcentaje de grasa al sustituir harina de maíz con CS al 20 y 40%. Del mismo modo, en cabras lecheras no hubo efecto sobre la PL, PL corregida al 3,5% de grasa, eficiencia de conversión y composición química, al comparar la suplementación con MZ y CS (Zambon et al., 2012). Si bien los trabajos mencionados anteriormente indican que no hubo efecto de la utilización de CS en reemplazo de MZ sobre las variables de producción y composición de la leche, algunos experimentos han mostrado que cuando los suplementos almidonosos son reemplazados por FDN de cascarilla de soja o pulpa de citrus durante la segunda mitad de la lactancia en ovejas, se observan incrementos significativos sobre el rendimiento de leche y de grasa (Cavani et al., 1990; Cannas et al., 1998; Zenou y Miron, 2005; Cannas et al., 2013; Nudda et al. 2014). En el presente trabajo, como en el de Gentil et al. (2011) y el de Zambon et al., (2012), los animales se encontraban en lactancia temprana (30 DEL), lo que conduce a preguntarnos si este factor, la fase de lactancia, podría ser una de las posibles razones por las cuales no hubo efecto del suplemento sobre la producción de leche y de grasa aún cuando los CMS y de FDN resultaron superiores en el tratamiento CS ($P < 0,05$).

Si bien es cierto que en lactancia temprana ocurren múltiples cambios hormonales y fisiológicos al mismo tiempo que el metabolismo intenta ajustarse a los elevados requerimientos energéticos de esa etapa (NRC, 2001), la relación “consumo-producción de leche” es más clara y estudiada en vacas en comparación con ovejas dado que se ha seleccionado mucho más para el carácter “producción de leche”. Es posible que el mayor CMS observado en el tratamiento CS no sea expresado en una mejora en la eficiencia de utilización del alimento para la producción de leche (Adin et al., 2009) del mismo modo que el mayor consumo de FDN no resultó en mayores concentraciones de grasa debido a la alta variabilidad entre individuos, más que al momento de la lactancia. Sumado a la alta variabilidad entre individuos, cabe mencionar el bajo número de animales que limita el poder de la prueba. Evidencia de esto puede ser la diferencia obtenida en PL, de un

24% mas en CS, sin observarse diferencias estadísticas. Por lo tanto, el efecto de la fuente suplementaria de energía sobre la performance lechera, en términos de producción y calidad, puede resultar muy variable y ser el resultado de la interacción de diversos factores como la especie animal, el individuo y el momento de la lactancia.

Independientemente de los resultados de las investigaciones citadas, Vasta et al. (2008), en una extensa revisión, concluyeron que es posible mantener la productividad animal y la calidad del producto final (tanto leche como carne) al utilizar fuentes energéticas alternativas como los suplementos de alto contenido de fibra (ej. cascarilla de soja) en dietas de rumiantes menores.

2.3.3. Perfil de ácidos grasos de la leche.

Del análisis de la composición de AG de la leche, reportado en el Cuadro 6, se observan diferencias entre los AG de cadena corta y media (C4:0 al C12:0; $P < 0,05$), resultando el ac. butírico en mayor concentración en el tratamiento CS (2,27 vs. 2,02g/100g AG; $P = 0,01$). Por el contrario, las concentraciones del C6:0, C8:0, C10:0 y C12:0 resultaron superiores en la leche de las ovejas que recibieron la dieta MZ ($P < 0,05$). Estos AG provienen de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria y, según lo indicado por Chilliard et al. (2001), dicha síntesis es afectada por el balance energético del animal para el mantenimiento del peso y la producción de leche. Un mejor balance energético puede reflejarse en cambios positivos del peso vivo y mayores niveles de producción de leche (Addis et al., 2005).

Sin embargo, aún habiendo obtenido diferencias en las concentraciones de los AG de cadena corta, las dietas no se diferenciaron en cuanto al peso vivo y la condición corporal, ni tampoco en la producción de leche ($P > 0,05$).

Si observamos aquellos AG de especial interés en salud humana, pueden verse notables diferencias tanto en las concentraciones de AL (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) como de ALN (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3) que fueron superiores en el tratamiento CS ($P < 0,05$), resultando en 3,38 vs 2,40 g/100g para C18:2 y de 0,86 vs. 0,44 g/100g para C18:3. Otros dos AG poliinsaturados de relevancia, como el EPA (C20:5) y el DHA (C22:6), derivados de la serie omega 3 (n3), también resultaron superiores en aquellas ovejas suplementadas con CS ($P < 0,05$). El tratamiento CS exhibe una mejor aptitud nutracéutica validada por su mayor concentración total de PUFA y de omega 3, superando al tratamiento MZ en 30% y 77%, respectivamente y además una tendencia en favor de la relación n6/n3, siendo de 4,50 para MZ y de 3,56 para CS ($P < 0,10$); de todos modos este índice es muy bueno en ambos casos. Mayores concentraciones de ac. linolénico y omega 3 en leche de cabras suplementadas con CS en reemplazo del maíz, fueron atribuidas por Zambon et al. (2012) al mayor contenido de C18:3 n3 en la cascarilla de soja.

Respecto del *cis*-9, *trans*-11 C18:2 CLA (ruménico), no se observaron diferencias entre tratamientos ($P=0,69$), aunque existen diferencias numéricas en favor de CS (1,65g/100g vs. 1,56 g/100g). Sin embargo, difirieron entre dietas las concentraciones de *trans*-11 C18:1 (vaccénico), siendo de 3,29 g/100g y de 2,42 g/100g para CS y MZ, respectivamente ($P < 0,05$). Esto resulta de especial importancia dado que ha sido bien documentada la relación existente entre las concentraciones de *trans*-11 C18:1 y *cis*-9, *trans*-11 CLA en leche, siendo el vaccénico la principal fuente de ruménico a nivel glándula mamaria gracias a la actividad del complejo enzimático delta-9 desaturasa (Grinari y Bauman, 1999).

Cuadro 6. Perfil de ácidos grasos de la leche de ovejas suplementadas con fuentes contrastantes de carbohidratos.

FAME (g/100g FAMES)	Tratamiento ¹		EEM ²	P – value ³		
	MZ	CS		Trat	Ti	Trat x Ti
C4:0	2,02 ^a	2,27 ^b	0,06	0,01	0,26	0,18
C6:0	1,88 ^a	1,75 ^b	0,06	0,13	0,10	0,18
C8:0	2,00 ^a	1,64 ^b	0,09	0,01	0,42	0,26
C10:0	6,11 ^a	4,90 ^b	0,29	0,01	0,42	0,32
C12:0	3,59 ^a	2,78 ^b	0,17	0,00	0,51	0,53
C14:0	7,97	7,80	0,24	0,64	0,35	0,61
C16:0	20,76	21,53	0,40	0,20	0,11	0,25
C16:1	1,92	1,84	0,06	0,40	0,25	0,95
C18:0	12,20	12,95	0,65	0,43	0,45	0,20
Trans-6-8 C18:1	0,40	0,41	0,02	0,74	0,20	0,69
Trans-9 C18:1	0,32	0,34	0,02	0,45	0,56	0,40
Trans-10 C18:1	0,72	0,56	0,19	0,56	0,19	0,65
Trans-11 C18:1 VA	2,42 ^a	3,29 ^b	0,25	0,02	0,84	0,26
Trans-12 C18:1	0,37	0,40	0,05	0,73	0,06	0,28
Cis-9 C18:1	23,03	21,75	0,69	0,21	0,21	0,15
Cis-11 C18:1	0,56	0,33	0,08	0,05	0,39	0,75
Cis-12 C18:1	0,37	0,51	0,06	0,10	0,74	0,61
Cis-14 + trans-16 C18:1	0,37	0,44	0,03	0,12	0,10	0,23
Cis-9, cis-12 C18:2 n6	2,40 ^a	3,38 ^b	0,24	0,01	0,91	0,83
Cis-9, cis-12, cis-15 C18:3 n3	0,44 ^a	0,86 ^b	0,04	0,00	0,05	0,02
Cis-9, trans-11 + trans-7, Trans-8, cis-10 C18:2 CLA	1,56	1,65	0,16	0,69	0,93	0,62
Trans-10, cis-12 C18:2 CLA	0,02	0,02	0,01	0,88	0,69	0,65
C20:4 n6	0,17	0,18	0,01	0,60	0,72	0,58
C20:5 n3	0,04 ^a	0,05 ^b	0,01	0,01	0,04	0,73
C22:6 n3	0,03 ^a	0,04 ^b	0,01	0,03	0,35	0,41
Total CLA	1,72	1,87	0,18	0,56	0,90	0,66
SFA	60,14	59,69	0,81	0,70	0,03	0,73
MUFA	30,59	29,93	0,55	0,41	0,02	0,55
PUFA	5,41 ^a	7,02 ^b	0,34	0,00	0,98	0,48
n3	0,59 ^a	1,05 ^b	0,04	<0,0001	0,11	0,02
n6	2,65 ^a	3,63 ^b	0,25	0,01	0,92	0,87
n6/n3	4,50	3,56	0,33	0,06	0,94	0,29
VA/CLA	1,43 ^a	1,78 ^b	0,09	0,01	0,73	0,35
Índice Δ9 –desaturasa	0,02 ^a	0,01 ^b	0,01	0,03	0,35	0,67
Índice de atherogenicidad	1,58	1,51	0,07	0,44	0,17	0,69

^{a-b} Superíndices en una misma fila indican diferencias entre medias.

¹ MZ= grano de maíz; CS = cascarilla de soja; ²Error estándar de la media; ³ Trat=tratamiento; Ti=tiempo de muestreo; Trat.xTi=interaccion. Diferencias significativas: P < 0,05; Diferencias altamente significativas: P < 0,01.FAME= ácidos grasos-metyl éster; VA= ácido vaccénico; CLA= ácido linoleico conjugado; SFA=sumatoria de ácidos grasos saturados; MUFA=sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados; PUFA= sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados; n3= ácidos grasos omega 3; n6= ácidos grasos omega 6.

En el presente estudio, y de acuerdo a la Figura 1, se ha obtenido una regresión altamente significativa entre las concentraciones (g/100g) de *trans-11* C18:1 y CLA

totales (el 90% corresponde al *cis-9, trans-11*), con un R^2 de 0,56 ($P < 0,0001$). Valores similares fueron obtenidos por Palladino et al. (2009) en vacas lecheras ($r=0,55$) y superiores, también en vacas lecheras por Bargo et al. (2003; $R^2=0,85$) y por Mele et al. (2006) en ovejas ($R^2=0,93$).

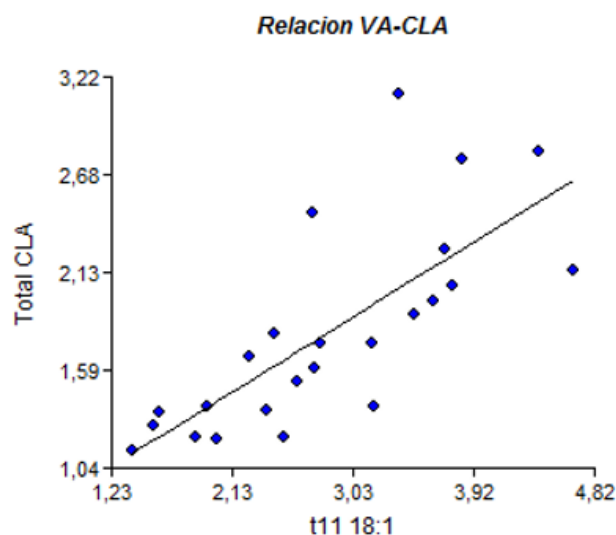


Figura 1. Relación entre las concentraciones (g/100g) de *trans-11* C18:1 y CLA totales en leche de ovejas.

A través de la relación VA/CLA es posible tener una aproximación de la eficiencia de transformación de vaccénico a ruménico. En el actual estudio, la relación VA/CLA obtenida para el tratamiento CS fue de 1,78, la cual difirió de la dieta MZ cuya relación VA/CLA fue de 1,43 ($P < 0,05$). En un estudio con ovejas consumiendo una dieta de raigrás fresco como único alimento, Addis et al. (2005) reportaron una relación VA/CLA de 1,76, muy similar a la obtenida para el tratamiento CS con una proporción de raigrás fresco del 50%. Stockdale et al. (2003) y Bargo et al. (2006) encontraron una relación positiva entre el consumo de forraje y la concentración de *cis-9, trans-11* CLA en la leche de vacas. Existe una mayor síntesis endógena de *cis-9, trans-11* CLA sobre sistemas pastoriles explicada por el mayor consumo de C18:3 respecto de C18:2. En estas condiciones, se produciría una mayor acumulación ruminal de vaccénico que luego en glándula mamaria será convertido a ruménico a través de la $\Delta 9$ -desaturasa, como fue indicado previamente (Loor et al., 2004).

Otro factor de influencia sobre el perfil de AG lo constituye la relación F:C difiriendo la sensibilidad a la misma según la especie. Nudda et al. (2014) indicaron menor incidencia de la relación F:C sobre la concentración de CLA en leche en ovejas en comparación con vacas. En este contexto, Gómez-Cortés et al., (2011a) reportaron una reducción en el nivel de ac. vaccénico y AL a medida que se incrementaba la relación F:C, no observando variaciones en la concentración de CLA en leche de ovejas.

Otros AG de interés, también intermediarios del proceso de BH del ac. linoleico (Bauman y Griinari, 2003), son el *trans-10* C18:1 y el *trans-10, cis-12* 18:2 CLA, ya que se asocian al llamado “Síndrome de baja grasa en leche” (MFD, según sigla en inglés). El MFD ha sido ampliamente estudiado y descrito en vacas lecheras por quien dio origen a dicha línea de investigación, el Dr. Bauman (Bauman y Griinari, 2001; Griinari y Bauman, 2006; Harvatine y Bauman, 2006; Bauman et al., 2008) y, en menor medida, en ovejas (Lock et al., 2006; Sinclair et al., 2007; Weerasinghe et al., 2007) y en cabras (Erasmus et al. 2004; Lock et al., 2008). Si bien las concentraciones de estos dos AG no

difirieron entre dietas ($P=0,88$), el *trans-10* C18:1 resultó numéricamente superior en el tratamiento MZ (0,72 g/100g AG vs. 0,56 g/100g AG) coincidiendo con una menor concentración de grasa en MZ (65,3 vs. 73,7g.kg⁻¹) que tampoco fue significativa, pero que podría indicar cierta asociación con el MFD.

De acuerdo con Buccioni et al., (2009), la presencia de isómeros *trans-10* 18:1 y *trans-10*, *cis-12* CLA fue inducida por una mayor proporción de concentrado en la dieta, al evaluar el efecto de distintas relaciones forraje:concentrado sobre el perfil de AG de licor ruminal de ovejas. Estos autores señalaron que un aumento en la proporción de concentrado alteraba los pasos normales del proceso de BH.

Tal vez estas respuestas no se deban únicamente al tipo de carbohidratos utilizado, almidonosos vs. fibrosos, sino a la degradabilidad de los mismos. Jurjanz et al. (2004) ponen en escena este concepto, comparando dos fuentes de almidón de distinta degradabilidad ruminal. Observaron que la leche proveniente de vacas alimentadas con almidón altamente degradable presentaba mayor concentración de isómeros *trans-10* C18:1 respecto de la leche proveniente de dietas con almidón de baja degradabilidad. Es posible plantearse, entonces, el interrogante de si existen diferencias notables entre la degradabilidad del grano de maíz y la cascarilla de soja que puedan provocar diferencias significativas en los *trans-10* en rumen y, en consecuencia, en la leche.

En el capítulo siguiente se avanza sobre estos aspectos al presentar los resultados del estudio de ambiente ruminal, desde los parámetros que caracterizan el medio hasta los perfiles de AG generados en ambas dietas.

2.4. Conclusiones.

Las ovejas suplementadas con cascarilla de soja presentaron mayor CMS en comparación con el maíz, posiblemente debido al efecto de sustitución por el cual el grano de maíz deprimió el consumo de forraje. Este mayor CMS se tradujo en mayor PL (24% más en CS) aunque no difirió estadísticamente por el bajo poder de la prueba.

Si bien el suplemento no tuvo un efecto diferencial sobre el porcentaje de proteína y grasa de la leche, esta última tuvo una calidad nutracéutica superior en la dieta CS. El mayor consumo de precursores de AG saludables y, posiblemente, factores metabólicos, operaron en favor del mayor pasaje y producción de PUFA y omega 3 en la leche de las ovejas suplementadas con cascarilla.

CAPITULO 3.

Efecto de la fuente de energía suplementada sobre el ambiente ruminal y el metabolismo de los ácidos grasos.

3.1. Introducción.

La suplementación en sistemas pastoriles resulta una estrategia nutricional necesaria para mantener niveles de producción adecuados (Bargo et al., 2006). La incorporación de suplementos energéticos induce cambios en el ecosistema ruminal, que resultan más acentuados conforme se incrementa la fermentabilidad de los mismos. Uno de los cambios más evidentes sobre las condiciones físico-químicas del rumen lo constituye el descenso del pH, lo que conduce a una reducción en la actividad celulolítica y consecuente caída de la degradabilidad de la fibra, y a cambios en la estructura de las poblaciones microbianas y sus metabolismos (Mould, y Ørskov, 1983; Russell 2002; Klieve et al. 2003; Sung et al., 2007; Wanapat et al., 2015).

En este sentido, todas aquellas características de la dieta que pueden reducir el valor medio diario de pH ruminal a valores inferiores a 6,25, como ser el menor tamaño de partícula, la alta proporción de concentrados, el exceso de almidón degradable en rumen, la ausencia de tampones o buffers, reducirían la eficiencia de la BH y pueden causar alteraciones en los intermediarios de dicho proceso (Grinari et al., 1998; Grinari y Bauman, 1999; Sauvant et al., 2000). Lee y Dewhurst (2010) señalaron que muchos mecanismos que inciden sobre la BH parecen operar a través de efectos sobre la lipólisis, la cual resulta afectada por bajos valores de pH (Van Soest y Nisbet, 1996; Harfoot y Hazlewood, 1997), el tamaño de partícula (Gerson et al., 1988), el avance en el estado de madurez, el secado o ensilado (Boufaied et al., 2003), entre otros.

Además del pH ruminal (Kalscheur et al., 1997; Kucuk et al., 2001; Schroeder et al., 2004; Troegeler-Meynadier et al., 2006), la relación forraje: concentrado (F:C) (Lor et al., 2004; Buccioni et al., 2009; Sterck et al., 2011) y el consumo y metabolismo ruminal de los AG (Jenkins et al., 2008; Kim et al., 2009) fueron señalados como algunos de los principales factores que modulan el proceso de BH. Valores de eficiencia de BH han sido reportados para un amplio rango de dietas alcanzando, en promedio, 93% y 85% para el C18:3n-3 y C18:2n-6, respectivamente (Doreau y Ferlay, 1994; Dewhurst et al., 2006; Fievez et al., 2007; Jenkins et al., 2008). Dado que la eficiencia de la BH está directamente relacionada con el tipo de dieta, la producción de intermediarios en el proceso puede variar ampliamente, generando distintos perfiles de AG en el rumen.

En condiciones de acidez ruminal y/o dietas ricas en almidón, se genera una fuerte producción de isómeros *trans-10*, tal como lo indica Lor et al. (2003) quienes reportaron incrementos en la concentración de *trans-10*, *cis-12* CLA en rumen cuando los animales son suplementados con un concentrado almidonoso, como el grano de maíz. Por el contrario, aquellas dietas pobres en concentrados conducen a una fuerte proporción de isómeros *trans-11*. Chilliard et al., (2007) indicaron que las dietas a base de forraje disminuyen los AG saturados en beneficio del *cis-9*, *trans-11* C18:2 y del C18:3.

Un mayor consumo de C18:3 puede asociarse con incrementos en las concentraciones de *cis-9*, *trans-11* CLA en leche. Esto puede deberse, para dietas altas en forraje, a la acumulación de *trans-11* vaccénico a nivel ruminal que luego es desaturado a ruménico en glándula mamaria o por mayor flujo duodenal de CLA, tanto *cis-9*, *trans-11* como otros isómeros *trans-11* en dietas suplementadas con aceite (Lor et al., 2004).

La suplementación con lípidos, como el uso de aceites vegetales y marinos, promueven un incremento en las concentraciones, no sólo de *cis-9*, *trans-11* CLA, sino

también de PUFA en la leche de rumiantes, tal como lo observado por Toral et al. (2012) en ovejas lecheras. Estos autores indican un cambio en los pasos normales del proceso de BH y la consiguiente acumulación de isómeros *trans-10* a expensas de los *trans-11* al utilizar suplementos con aceite de girasol y algas, resultados que atribuyen a cambios en el ambiente ruminal y a la composición del microbioma.

Asimismo, Boeckeaert et al. (2008) reportaron para vacas lecheras alimentadas con dieta TMR (“total mixed ration”, según sigla en inglés) enriquecida con almidón versus dietas con bajos niveles de almidón, una mayor producción de *trans-10* C18:1, no obstante no se detectaron disminuciones en el pH ruminal. En contraste, sobre un sistema 100% pastoril y aún con bajos pH ruminales, no fue detectado el isómero *trans-10*, *cis-12* CLA en rumen y ni en leche (Palladino et al., 2014), lo que sugiere que existirían otras variables, aparte del pH ruminal, que pueden alterar los patrones de la BH. Buccioni et al. (2009) en un trabajo *in vitro* utilizando licor ruminal de ovinos mostraron que la presencia de *trans-10*, *cis-12* CLA y *trans-10* C18:1 en rumen fue inducida no sólo por una mayor proporción de concentrado sino además por el aporte de suplementación lipídica con aceite de soja, alterando los pasos típicos del proceso de BH (Bauman y Grinarii, 2001).

Si bien existen suficientes evidencias que indican un efecto depresor sobre la eficiencia de BH causado por el descenso del pH ruminal (Grinarii et al., 1998; Grinarii y Bauman, 1999; Sauvant et al., 2000; Troegeler-Meynadier et al., 2003; Ribeiro et al., 2007), aún no están del todo dilucidados los mecanismos biológicos involucrados. Estos mecanismos podrían estar vinculados con cambios en las poblaciones microbianas, lo cual será discutido en el próximo capítulo donde se presentan los resultados del estudio de microbioma ruminal a través de la utilización de técnicas de Next Generation Sequencing.

El objetivo del presente experimento fue estudiar el efecto del suplemento energético con énfasis sobre el ambiente ruminal (pH, ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal) y los AG generados en el proceso de BH.

3.2 Materiales y Métodos.

El experimento fue llevado a cabo en el tambo experimental ovino, ubicado en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA). Una pastura de raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.) fue utilizada durante la etapa experimental para proveer forraje fresco que fue cortado diariamente y suministrado en comedero.

3.2.1. Animales y diseño experimental:

Todos los procedimientos que involucraron el manejo de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Departamento de Producción Animal, FAUBA.

Se utilizaron seis ovejas lecheras provistas de cánula ruminal ($78,19 \pm 13,53$ Kg PV) a las cuales se les indujo la lactancia artificialmente mediante la aplicación intramuscular de 0,25 mg/Kg PV de cipionato de estradiol + 0,75 mg/Kg PV de progesterona en días alternos (día 1 al 13) y 0,40 mg/Kg PV de prednisolona durante 3 días consecutivos (día 14 al 16) (Alifakiotis et al., 1980). El día 17 posterior a la primera inyección se comenzó con el ordeño diario.

Las ovejas fueron alojadas en corrales individuales con libre acceso al agua de bebida y se les ofreció la dieta a razón del 4% del peso vivo en base seca (PVbs). Fueron

asignados a uno de dos tratamientos: Grano de Maíz (MZ) y Cascarilla de Soja (CS). El diseño experimental fue un *cross-over*, con tres períodos (2 x 3) cuya duración fue de 14 días (10 días de acostumbramiento y 4 días de medición). Los animales consumieron la dieta CS o MZ durante 10 días y luego se les realizaron las mediciones los 4 días siguientes. El día 15, se realizó el cambio de contenido ruminal entre tratamientos de modo de acortar la etapa de adaptación (en lugar de 15 días como se suele utilizar en los estudios de nutrición de rumiantes, fue de 10 días) y se consideró como el “día 1” del período siguiente.

Esquema del diseño *cross-over* 2x3:

	Grupo 1			Grupo 2		
Secuencia de Tratamientos:	CS- MZ-CS			MZ-CS-MZ		
Período:	I	II	III	I	II	III
Animales por grupo:	3			3		
Observaciones por tratamiento:	9			9		

Las dietas se formularon en base seca (bs) según NRC (1985) y fueron balanceadas con expeller de soja de modo que resulten isonitrogenadas (16% PBbs). El raigrás anual se cortaba al mediodía y se ofrecía fresco en comederos individuales, separados del suplemento. El suplemento, integrado por el concentrado energético más el expeller de soja y suplemento vitamínico-mineral (correctamente mezclados) fueron suministrados media hora después del forraje fresco. La ración diaria se ofreció a una relación forraje: concentrado de 50:50 (es idéntica a la proporcionada en el experimento del capítulo 2). El PV fue registrado al inicio de cada período experimental y la CC fue evaluada en una escala de 1 a 5, con puntos intermedios cada medio punto, al mismo momento de pesaje de los animales (Russel et al., 1969).

3.2.2. Muestreos y análisis.

Composición química de alimentos:

Para el muestreo se procedió según lo descripto en el capítulo previo. Los alimentos, tanto concentrados como forrajes, fueron caracterizados por materia seca absoluta (MS 105°C), fibra insoluble en detergente neutro (FDN), fibra insoluble en detergente ácido (FDA), lignina insoluble en detergente ácido (LDA), proteína bruta (PB) y cenizas (CE). Para estas determinaciones, todas las muestras fueron secadas en estufa de aire forzado a 65°C durante 48 h y luego molidas a un tamaño de malla de 1mm utilizando un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA) excepto para el análisis de ácidos grasos (alimentos y licor ruminal) para el cual las muestras se tomaron e inmediatamente almacenaron a -20°C, para luego ser secadas por liofilización.

Cuadro 7. Composición química de los alimentos que integran el suplemento (pool de los tres períodos).

	Cascarilla de soja	Grano de maíz	Expeller de soja
MS (g/Kg)	930,6	895,9	940,5
CE (g/Kg)	245,9	15,20	66,3

PB (g/Kg)	151,2	84,7	420,3
FDN mo (g/kg MS)	514,5	94,4	127,7
FDA mo (g/kg MS)	351,0	23,73	67,7

MS: materia seca; CE: cenizas; PB: proteína bruta; FDNmo: fibra insoluble en detergente neutro de la materia orgánica; FDAmo: fibra insoluble en detergente ácido de la materia orgánica.

Cuadro 8. Perfil de ácidos grasos de los alimentos que componen el suplemento (pool de los tres períodos).

FAMES (g/100g FAMES)	Cascarilla de soja	Grano de maíz	Expeller de soja
16:0	12,22	11,95	12,02
16:1 C9	Nd	Nd	0,08
18:0	4,73	2,08	4,32
18:1 C9	18,21	31,29	17,68
18:2 n6	53,98	45,26	53,15
20:0	Nd	0,57	0,30
18:3 n3	7,30	1,24	7,44

FAMES: fatty acid methyl esters.

Cuadro 9. Composición química de raigrás fresco en los distintos períodos experimentales (I, II y III) (pool por cada período).

	I	II	III
MS (g/Kg)	282,9	208,1	248,6
CE (g/Kg)	116,3	120,5	111,8
PB (g/Kg MS)	127,9	174,2	163,7
FDN (g/kg MS)	558,1	542,0	500,4
FDA (g/kg MS)	289,4	281,5	281,5
LDA (g/kg MS)	45,4	31,2	44,6

MS: materia seca; CE: cenizas; PB: proteína bruta; aFDNmo: fibra insoluble en detergente neutro de la materia orgánica; FDA mo: fibra insoluble en detergente ácido de la materia orgánica; LDA mo: lignina insoluble en detergente ácido de la materia orgánica.

Cuadro 10. Perfil de ácidos grasos de raigrás fresco en los distintos períodos experimentales (I, II y III) (pool por cada período).

mg FAME/ kg MS raigrás	I	II	III
12:0	0,76	0,79	0,70
14:0	1,17	0,77	1,47
15:0	0,16	0,12	0,15
i16:0	5,07	6,21	5,14
16:0	17,63	20,54	26,94
16:1 c7	2,19	2,57	1,94

16:1 c9	0,27	0,36	2,10
17:0	0,19	0,20	0,33
17:1 c10	1,73	1,90	1,86
18:0	1,45	1,72	5,76
18:1 n9	2,82	2,91	1,57
18:2 n6	8,47	12,90	12,24
20:0	0,81	0,57	0,69
18:3 n3	37,02	55,45	44,07
20:3 n3	1,14	1,03	0,89
24:0	1,41	1,81	1,56
24:1 n9	0,69	0,72	0,47

FAMES: fatty acid methyl esthers.

Consumo y digestibilidad.

El CMS de forraje se cuantificó diariamente por diferencia entre oferta y remanente en comedero, con la corrección por el valor diario de MS. La evaluación de digestibilidad *in vivo* se realizó durante los tres períodos experimentales, utilizando los mismos arneses de digestibilidad que en el Exp. I (capítulo I) y el mismo procedimiento. Se tomó una submuestra del 10% de las heces para la corrección por MS.

Variables ruminales:

Para la caracterización del ambiente ruminal, se tomaron muestras de licor de rumen (fase sólida mas líquida) desde el saco ventral a intervalos de 4 hs durante un lapso de 24 hs (08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 00:00 y 04:00 hs), el último día de medición (día 14 de cada período). Sobre estas muestras se determinó:

- pH, al momento del muestreo.
- Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV), en las muestras conservadas refrigeradas.
- Perfil de ácidos grasos (AG), en muestras liofilizadas y almacenadas a -20°C.

Técnicas de referencia:

- Fibra en detergente neutro, fibra en detergente ácido y lignina en detergente ácido (FDN, FDA y LDA): por el método secuencial, con α -amilasa y sin sulfito de sodio, acorde al procedimiento descrito por Van Soest et al. (1991) en un baño procesador (Ankom Technology Corp., Fairpoint, NY, USA).
- Proteína bruta (PB): por técnica micro Kjeldahl transformando el N obtenido en PB mediante el factor 6,25 (AOAC, 1990).
- Cenizas (CE): ignición completa en horno mufla a 550°C durante 4 horas (AOAC, 1990).
- Nitrógeno amoniacal (N-NH₃): según técnica propuesta por Bremen y Bretnke (1983), utilizando espectrocolorimetría con kit de uremia (Laboratorios Weiner, 2003).
- Ácidos grasos volátiles (AGV): por cromatografía gaseosa (Konic SP 3000 HRLG, columna de vidrio en fase estacionaria 10% SP 1200/1% H₃PO₄ en cromosorb WAW 80/100).

- Ácidos grasos en forrajes y concentrados: análisis por cromatografía gaseosa, utilizando el procedimiento de metilación en un paso descripto por Sukhija y Palmquist (1988).
- Ácidos grasos en licor de rumen: obtención del extracto lipídico mediante la metodología Folch y luego se trans metiló según el procedimiento descripto por Parks y Goins (1994). Los ácidos grasos metilados se separaron por cromatografía gaseosa (Clarus 500, PerkinElmer) utilizando una columna capilar CP-Sil 88 (100 m × 0.25 mm de diámetro interno; Varian, USA). Cada muestra se analizó dos veces con distintas relaciones de Split para mejor separación e identificación de los distintos picos; relación 100:1 para los ácidos grasos saturados y mono-insaturados cis y trans, y 10:1 para identificar los PUFA y los distintos isómeros del CLA. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Para la identificación de los tiempos de retención de los distintos ácidos grasos se utilizaron estándares comerciales (Cat#18920, SUPELCO; Cat#24152, SUPELCO; Cat# O5507, Sigma; Cat# 46905-U, SUPELCO; Cat#1254, Matreya; Cat#1255, Matreya; Cat#1256, Matreya; Cat#1257, Matreya; Cat#1259, Matreya). Como estándar interno se utilizó C23:0 (Cat# 1186, Matreya). El contenido de lípidos se obtuvo a través del área total de ácidos grasos determinados en el cromatógrafo y el área del estándar interno C23:0 (Cat# 1186, Matreya).

Producción y composición química de leche.

La producción individual de leche (g.d^{-1}) fue calculada como la suma de la producción de los dos ordeñes, a las 08:00 y 16:00, respectivamente. Se colectaron diariamente muestras de leche en tubos Falcon de 50ml en cada uno de los ordeñes y luego se formaron dos muestras compuestas por animal por período (una de ellas se analizó, la otra se reservó como “back up”). Fueron almacenadas a 4°C con bronopol como conservante para el posterior análisis de grasa, proteína y sólidos totales con tecnología MilkoScan.

3.2.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SAS (SAS Institute, 2008). Los resultados fueron analizados por ANVA de acuerdo al diseño experimental empleado (*cross-over*; $\alpha = 0,05$) utilizando un procedimiento de modelos mixtos con medidas repetidas siendo el animal el factor aleatorio. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \text{trati} + \text{períodoj} + \text{trati} \times \text{períodoj} + \text{Error}_{ij}$$

donde: μ es la media general, **trati** es el efecto del tratamiento (MZ y CS), **períodoj** representa el período del diseño (I, II, III), **trati x períodoj** es la interacción, y **Error_{ij}** es el error experimental. En el caso de las variables de ambiente ruminal (pH, AGV, N-NH₃), el tiempo de muestreo fue agregado al modelo y se denominó “hora”:

$$Y_{ij} = \mu + \text{trati} + \text{períodoj} + \text{hora} + \text{trati} \times \text{hora} + \text{Error}_{ij}$$

Las diferencias significativas fueron declaradas a $P < 0,05$ y las tendencias discutidas a $P < 0,10$.

3.3. Resultados y discusión.

3.3.1. Consumo y digestibilidad.

Los resultados de performance se presentan en el Cuadro 11. El CMS de suplemento fue mayor para las ovejas que consumieron MZ ($P < 0,05$), no obstante esto no se tradujo en cambios en el CMS total y de forraje ($P > 0,05$). Estos resultados son contrarios a los reportados en el capítulo anterior en el cual, tanto el CMS total y de forraje fueron superiores en el tratamiento CS, no existiendo diferencias en el consumo de suplemento. Es probable que las diferencias se deban a un posible cambio en el potencial de consumo y comportamiento ingestivo de las ovejas en el presente ensayo, respecto del ensayo anterior, ya que la fistulación y presencia de cánula ruminal puede producir cambios en los patrones de consumo.

Desde la difusión del uso de la fistulación de animales con fines científicos en la década de 1920, pasando por las primeras mediciones *in vivo* de pH ruminal con vacas fistuladas en el estudio de Smith en 1941, ha sido sugerido que la implantación de la fístula de rumen podría generar ciertos cambios en los animales. En primer término, podría alterar la fisiología digestiva luego de la cirugía, dado que la adhesión de parte del saco dorsal a los tejidos de la pared del cuerpo afectaría los movimientos asociados a eructación y contracciones secundarias de rumia de este saco (Iggo y Leek, 1970). Esto ocasionaría una reducción en la fuerza y frecuencia de las contracciones musculares del saco dorsal, pudiendo afectar el flujo de la digesta en rumen y, consecuentemente, el consumo voluntario (Priego y Sutherland, 1977). Sin embargo, Kristensen et al. (2010) en una publicación sobre la técnica de canulación ruminal en terneras Holstein indicaron que no hubo efectos detrimentales sobre el consumo o la ganancia de peso. Del mismo modo, Moate et al. (2013) en un estudio sobre vacas lecheras señalaron que la canulación ruminal no afectó el CMS total, aunque sí observaron una pequeña diferencia, no significativa desde el punto de vista estadístico, sobre el consumo de grano, que resultó superior en vacas canuladas.

Tanto el tipo de suplemento energético, sea fibroso (high fiber supplement; HFS) o almidonoso (high starch supplement; HSS), como su porcentaje de inclusión en la dieta modifican la respuesta animal y el aprovechamiento del forraje base (Bargo et al., 2003). Debido a que el CMS del forraje no difirió entre tratamientos, no se puede asegurar que hubo un efecto de sustitución del consumo de raigrás por el consumo de grano de maíz en la dieta MZ por efectos asociativos negativos a nivel ruminal (Dixon y Stockdale, 1999), tal como se discutió en el capítulo anterior. Sin embargo, los posibles cambios en el comportamiento ingestivo por efecto de la fístula ruminal, sumado a los cambios observados en las variables ruminales que se discutirán más adelante, no permiten descartar la posibilidad de interacción entre forraje y grano.

Cuadro 11. Efecto de la fuente energética suplementada sobre la performance animal.

Variable	Tratamiento ¹		EEM ²	Significancia ³		
	MZ	CS		T	P	PxT
Consumo MS total (g.kg ⁻¹ PV ^{0,75})	71,7	71,0	4,32	NS	NS	NS
Consumo MS forraje (g.kg ⁻¹ PV ^{0,75})	34,9	36,5	2,70	NS	NS	NS
Consumo MS suplemento (g.kg ⁻¹ PV ^{0,75})	37,2 ^a	32,3 ^b	2,60	*	NS	NS
Digestibilidad MS (g.kg ⁻¹)	832,3 ^a	757,1 ^b	1,49	**	*	NS
Producción leche (g.d ⁻¹)	674,6	581,9	175,99	NS	*	NS
Grasa (g/100 g)	5,98 ^b	7,78 ^a	0,449	*	NS	

Proteína (g/100 g)	6,24	6,98	0,620	NS	NS	*
Sólidos totales (g/100 g)	18,12	19,70	1,117	NS	NS	NS

^{a-b} Superíndices en una misma fila indican diferencias entre medias.

¹MZ= grano de maíz; CS = cascarilla de soja; ²Error estándar de la media; ³T=tratamiento; P=período; TxP= Interacción; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$;

NS = no significativo.

Es sabido que niveles incrementales de grano en dietas pastoriles resultan en reducciones en el CMS de la pastura e incrementos en el CMS total (Tozer et al., 2004; Molle et al., 2008; Aguerre et al., 2009). Esto se explica, básicamente, por un incremento en la digestibilidad de la dieta total conforme aumenta la inclusión de grano (Dixon y Stockdale, 1999), lo cual mejora la tasa de pasaje y, en consecuencia, el consumo. En consistencia con el experimento anterior, la digestibilidad de la MS fue mayor para la dieta suplementada con MZ en comparación con CS ($P < 0,01$), con una diferencia de aproximadamente 8 puntos porcentuales (75,71 vs. 83,23%).

Existen otras teorías que explican la tasa de sustitución, además de los efectos asociativos a nivel ruminal. Una de las más ampliamente aceptadas, postulada por McGilloway y Mayne (1996), explica el menor consumo de forraje por una reducción en el tiempo de pastoreo. En nuestro experimento, todos los animales recibieron el forraje cortado en comedero, teniendo libre acceso al mismo las 24hs del día, por lo cual no es posible considerar esta teoría para el actual experimento.

3.3.2 Producción y calidad de leche.

El Cuadro 11 muestra que no se detectaron diferencias entre tratamientos para la producción de leche ($P > 0,05$) aunque hubo diferencias debidas al período experimental ($P < 0,05$). Respecto de la calidad, el porcentaje de grasa fue mayor para el tratamiento CS ($P < 0,05$) mientras que no se registraron diferencias significativas para el resto de las variables de composición química (Cuadro 11). Dado que el contenido de grasa difirió entre dietas y representa una variable de especial interés, no sólo en el aspecto científico sino en el productivo también, lo discutiremos en esta sección con mayor detalle.

MacGregor y Owen (1976) observaron en vacas que la cascarilla de soja en reemplazo del maíz redujo la producción de leche a un nivel de inclusión cercano al 30% en la dieta. Posteriormente, en niveles de inclusión superiores, Nakamura y Owen (1989) muestran similares resultados, evaluando un porcentaje de inclusión de cascarilla del 48% en comparación con una dieta control con grano de maíz al 45%. Del mismo modo, el estudio de Ipharraguerre et al. (2002), indica que la producción de leche tuvo una tendencia a decrecer con dietas suplementadas con cascarilla de soja a partir de un nivel de inclusión del 40%. Estos autores señalan que este nivel de inclusión de CS restringe tanto la cantidad como la fuente de energía disponible a nivel duodenal para ser absorbida y traslocada a la glándula mamaria por el menor CMS observado en esta dieta (ver capítulo I). Además, la alta inclusión de cascarilla en reemplazo del grano de maíz reduce la producción de ácido propiónico a nivel ruminal, el cual es uno de los principales precursores del metabolismo gluconeogénico en rumiantes.

Sin embargo, ya fue discutido en el capítulo anterior que los resultados sobre la performance lechera con la inclusión de CS en reemplazo de MZ, tanto en vacas como en ovejas y cabras, son contradictorios. Además del nivel de inclusión del suplemento, otros factores de incidencia podrían ser el momento de la lactancia y la alta variabilidad entre animales. Estudios ya citados sobre lactancia temprana (Gentil et. al., 2011; Zambon et. al., 2012) no muestran diferencias en PL en respuesta al uso de la cascarilla, en contraste

con aquellos trabajos donde los animales están en lactancia media (Cavani et al., 1990; Cannas et al., 1998; Zenou y Miron, 2005; Cannas et al., 2013).

Durante la lactancia, el consumo tiende a incrementarse conforme aumenta la demanda energética, recuperándose luego de la disminución característica previa al parto (Grummer, 1995). Sin embargo, en la primera fase de la lactancia, esa demanda aumenta más rápidamente que el potencial de consumo de MS, por lo cual la energía consumida no es suficiente para cubrir los requerimientos de producción, existiendo un desacople entre oferta de nutrientes-requerimientos (Bell, 1995; Chilbroste et al., 2012a, citado por Meikle, 2013). El estado fisiológico del pre y posparto inmediato modula el nivel de consumo a través de mecanismos hormonales, principalmente, de modo que en lactancia temprana la oveja se ve forzada a la movilización de reservas para sostener la producción de leche (Brancacci Lopes Zeola et al., 2015). Esto puede derivar en pérdidas de peso y condición corporal, lo cual está íntimamente ligado a la intensidad del balance energético negativo (Grummer, 1995; Susin, 1996; Butler, 2005).

En cuanto a la composición de la leche, en este experimento se obtuvo mayor porcentaje de grasa en la dieta CS (7,78 vs. 5,98%). De acuerdo con Pulina y Nudda (2004) el porcentaje de grasa de la leche de oveja ronda el 6,5%, casi el doble de grasa respecto de la vaca y cabra (6,5 vs. 3,5%). Sin embargo, Matar et al. (2017) destacan, no sólo el efecto de la dieta, sino a la raza como otro factor de incidencia sobre el porcentaje de grasa de la leche, reportando en ovejas Najdi un promedio de 4,41% y comparándolo con 6,2% en ovejas Awassi (Nudda et al., 2002) y 7,4% en raza Lacaune y Manchega (Castillo et al., 2009). Referencias nacionales señalan para la raza Pampinta, utilizada en estos experimentos, un promedio de 7,2% (Suárez, 2004) y 7,44% (Bucetti, 2004). En la dieta CS observamos que el porcentaje de grasa resulta superior a estos valores (Cuadro 11).

La cascarilla de soja como fuente de fibra altamente degradable (Basti et al., 2000; Ipharraguerre y Clark, 2003; Vasta et al., 2008; Hein, 2009) puede generar una elevada producción de ácido acético a nivel ruminal. A partir de tempranas investigaciones en metabolismo y absorción de los AGV en rumiantes ha quedado demostrado que el acético es el principal precursor de la grasa de la leche (Baldwin et al., 1965; Ballard y Hanson, 1965; Orskov et al., 1969; Vernon et al., 1981; Xiong et al., 2002; Schmidt y Zsédely, 2011). Ballard y Hanson (1965) fueron los primeros en explicar que la glucosa era un pobre precursor de los AGCL y, por lo tanto, era el acético y no la glucosa, considerado el principal generador de acetyl-CoA para la síntesis *de novo* de AG. Con el objetivo de estudiar la eficiencia de utilización de los AGV para distintas funciones fisiológicas en vacas lecheras, Orskov et al., (1969) formularon dietas para inducir el descenso de la grasa de la leche y comprobaron la existencia de una relación directa entre infusiones intrarruminales de ácido acético con subsiguientes incrementos en la grasa de la leche.

Desde esos primeros estudios con bases más fisiológicas, hasta los más avanzados de la actualidad, con la utilización de técnicas moleculares para explicar las “señales” que activan o silencian genes que codifican para la síntesis de grasa (Sandeep et al., 2010; Dervishi et al., 2012; Hussein et al., 2013; Li et al., 2013), no quedan dudas sobre el rol del acético en el metabolismo lipogénico. Desde un análisis más productivista, Schmidt y Zsédely (2011) indican que es muy beneficiosa la degradación de la fibra ya que cerca de un 65% del acético generado en rumen se destina a la síntesis de grasa butirosa en glándula mamaria.

Como se verá en la sección siguiente con los resultados de ambiente ruminal, el mayor porcentaje de grasa en las ovejas del tratamiento CS coincide con una mayor concentración de ácido acético a nivel ruminal.

Por otro lado, la reducción en el contenido de grasa, sin cambios en los otros componentes o variaciones en la producción, ha sido caracterizado por Davis y Brown (1970) como “Síndrome de baja grasa en leche” o MFD, que se observa con determinadas dietas y que también genera cambios en la composición de los AG de la misma (Bauman y Grinarii, 2001). El MFD, tal como mencionamos en el capítulo anterior, ha sido ampliamente documentado en vacas lecheras y representa un nivel de producción de grasa por debajo del potencial genético del animal (Harvatine, 2012), con reducciones típicas de 10-30% hasta casos más extremos donde el contenido de grasa puede reducirse hasta un 50% (Shingfield, 2009). Usualmente se observa en rumiantes alimentados con dietas de alta fermentabilidad como las dietas con alto contenido de grano o aquellas suplementadas con aceites vegetales (Doreau et al., 1999), obteniendo distintos grados de reducción de grasa en leche según el sistema sea intensivo o extensivo (Harvatine, 2012).

Chilliard et al. (2003) indicaron para el MFD que las cabras y ovejas responden de modo diferente respecto de las vacas y destacaron que eran escasas las investigaciones en estas especies. Sin embargo, en la última década se han publicado varios trabajos que reportan el MFD en ovejas y cambios en el perfil de AG de la leche, describiendo los mecanismos que los regulan a través de alteraciones en la BH, cambios en el microbioma ruminal y regulación génica de la síntesis de grasa en glándula mamaria, en raciones suplementadas con aceites vegetales y marinos (Lock et al., 2006; Gómez-Cortés 2008, 2009; Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2010, 2012; Bichi et al., 2013; Hussein et al., 2013; Toral, et al., 2016; Suarez-Vega et al., 2017).

En la dieta MZ el porcentaje de grasa se reduce casi un 20% con respecto a los valores de referencia señalados por Suárez (2004) y Bucetti (2004), sin cambios en PL o los otros componentes, respondiendo a la definición del MFD observado en dietas de alta fermentabilidad. Baumgard et al. (1999) fueron los primeros en demostrar que una reducción en el porcentaje de grasa en leche de vacas se asociaba específicamente a la infusión intrarruminal del isómero *trans-10, cis-12* CLA, lo que sentó las bases para explicar el mecanismo que genera el denominado “Diet-induced MFD” (Síndrome de baja grasa en leche inducido por la dieta), hoy considerado por los nutricionistas como una medida de manejo con potencial uso sobre el “output” de grasa (Bauman y Grinarii, 2003; Bauman et al., 2003; Grinarii y Bauman, 2006). El *trans-10, cis-12* 18:2 CLA resulta un potente inhibidor de la síntesis de grasa en leche (Baumgard et al., 1999; 2000a, b; 2001), cuyo mecanismo de inhibición incluye la disminución de la expresión génica de las enzimas involucradas en la captación y transporte de AG, de la síntesis *de novo*, la desaturación de los mismos y la síntesis de triglicéridos (Baumgard et al., 2002).

3.3.3 Ambiente ruminal.

En el Cuadro 12 se presentan los resultados que describen el ambiente ruminal para ambas dietas. No hubo diferencias entre tratamientos para producción total de AGV (mmol/L), no obstante se registraron diferencias en la concentración de ácido acético, propiónico y butírico (Cuadro 12). Los animales que fueron suplementados con CS presentaron mayores concentraciones de ácido acético ($P < 0,01$) y menores de propiónico ($P < 0,01$) y butírico ($P < 0,05$). Como consecuencia, la relación acético:propiónico fue mayor para el tratamiento CS ($P < 0,01$). El pH ruminal resultó superior en la dieta CS ($P < 0,01$) al igual que la concentración de N-NH₃ ($P < 0,05$).

Cuadro 12. Efecto del suplemento energético sobre el ambiente ruminal.

Variable	Tratamiento ¹	EEM ²	Significancia ³
----------	--------------------------	------------------	----------------------------

	MZ	CS		Trat	P	H	PxTrat	HxTrat
AGV totales (mmol/L)	104.3	101.4	2.85	NS	*	**	NS	NS
Acético (mmol/L)	66.4 ^b	74.7 ^a	2.23	**	**	**	NS	NS
Propiónico (mmol/L)	28.1 ^a	19.7 ^b	1.49	**	†	**	NS	NS
Butírico (mmol/L)	9.8 ^a	7.3 ^b	0.58	*	NS	*	NS	NS
Relación Ac:Prop	2.58 ^b	3.97 ^a	0.172	**	NS	**	NS	NS
N-NH ₃ (mg/dL)	7.62 ^b	10.15 ^a	1.098	*	†	**	*	NS
pH	5.80 ^b	6.11 ^a	0.053	**	NS	*	NS	NS

^{a-b} Superíndices en una misma fila indican diferencias entre medias.

¹MZ = grano de maíz; CS = cascarilla de soja; ²Error estándar de la media; ³Trat=tratamiento; H= hora de muestreo; P=período; PxTrat, HxTrat=interacciones; * = P < 0,05; ** = P < 0,01; † = P < 0.1; NS = no significativo.

Además de las diferencias observadas entre tratamientos, todas las variables que caracterizan al ambiente del rumen fueron variando en los distintos horarios (Cuadro 12). En la Figura 1 se ilustran los cambios en pH y concentración de AGV totales a lo largo del día. En ambos tratamientos, observa que el pH ruminal comienza a descender y los AGV totales a aumentar luego de que los animales son alimentados (12 hs).

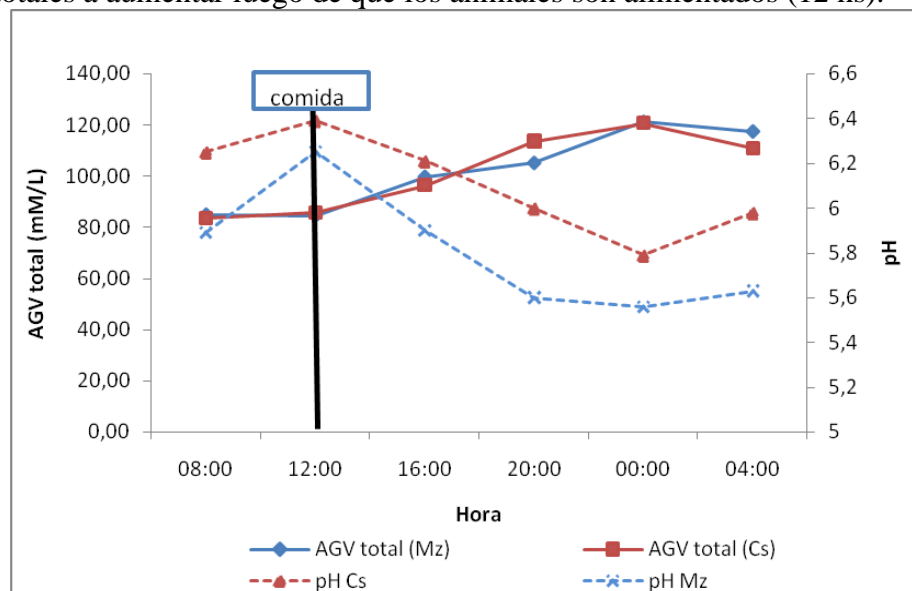


Figura 2. Efecto de la suplementación con CS o MZ sobre la producción de AGV totales y el pH ruminal a lo largo del día. No hubo interacción tratamiento*hora ($P > 0.05$).

Ferreira et al. (2011) indicaron que la inclusión de cascarilla de soja en la dieta de rumiantes como remplazo del grano de maíz aumenta el pH ruminal lo que, de acuerdo con diversos autores, parece ser más adecuado para la actividad del microbioma en su conjunto (Highfill et al, 1987; Anderson et al., 1988; Galloway et al., 1993; Mansfield y Stern, 1994; Elliott et al, 1995). Si bien los AGV totales fueron similares, en el tratamiento MZ, el pH siempre se mantuvo por debajo del tratamiento CS. Por otra parte, en la dieta con maíz parecería que el pH desciende hasta las 20:00 hs, manteniéndose en los valores mínimos registrados hasta las 04:00 hs, mientras que en la dieta de cascarilla sigue disminuyendo hasta las 00:00 hs, lo cual indicaría que la dieta MZ tiene una mayor tasa de fermentación inicial.

De acuerdo con Allen et al. (1997), el pH depende del perfil de AGV y su tasa de producción y absorción, entre otros factores, teniendo un rango de variación diaria de 1 a

1.2 puntos. Para el actual experimento, los rangos de pH fueron de 1,33 para la dieta CS (5,43 – 6,76) y más amplio para MZ, de 1,49 unidades (5,17 – 6,66). Más allá del rango de variación, es importante el tiempo (hs del día) de “bajo pH” o pH inferior a 6. En este sentido, el cambio en el microbioma asociado al MFD ocurre antes de que la variación de pH sea detectable y estaría más vinculado al tiempo de “bajo pH” que al valor en sí mismo (Harvatine, 2012). De acuerdo con las curvas de la figura 2, en el tratamiento CS el pH se mantuvo todo el día por encima de 6, excepto alrededor de la hora 0 y 4.00, en contraste con el tratamiento MZ que sólo estuvo por encima de 6 alrededor de las 12 del mediodía, previo al momento de suministro del alimento. El bajo pH puede afectar no sólo a las bacterias celulolíticas sino también puede inhibir el crecimiento y actividad de las metanogénicas, correlacionadas positivamente con las primeras (Hegarty, 1999). Son varias las evidencias que demuestran que el incremento del consumo de carbohidratos altamente digestibles se asocia con condiciones acidóticas en rumen, con valores de pH inferiores a 6, y reduce la actividad de las bacterias fibrolíticas e incrementa la actividad de las amilolíticas y lácticas (Russell 2002; Klieve et al. 2003; Nagaraja y Titgemeyer 2007).

En cuanto a la producción de AGV totales, la ausencia de diferencias entre tratamientos puede deberse a que ambos grupos consumieron aproximadamente la misma cantidad de alimentos de similar calidad. Nygren et al. (2008) tampoco encontraron diferencias significativas en AGV totales entre novillos que consumían cascarilla de soja o maíz. Sin embargo, el tipo de carbohidrato afectó la proporción de los distintos ácidos grasos, siendo mayor el acético y menor el propiónico para CS. Desde hace varias décadas se sabe que las concentraciones y relación de los principales AGV producidos en el rumen varían con la fuente de carbohidratos de la dieta y la edad del animal, no obstante suelen mantenerse dentro de los siguientes rangos: acético, 60-75%; propiónico, 15-25% y butírico, 10-15% (Hungate et al., 1966), siendo en dietas de alta proporción de forraje de aproximadamente 65% acético, 20% propiónico y 15% butírico (Wattiaux y Armentano, 2007). Otros autores reportaron resultados similares, como Elliott et al. (1995) y Pantoja et al. (1994), quienes observaron que con la inclusión de un 18% y 20% de MS de CS respectivamente, la producción de propiónico disminuyó con respecto a aquellos animales que consumieron MZ.

Existen dos puntos importantes a señalar respecto a las diferencias observadas en los distintos AGV. Por un lado, el acético es el precursor de los ácidos grasos de cadena corta y media de la leche, por lo cual la mayor concentración de acético podría explicar el mayor contenido de grasa de la leche en las ovejas del tratamiento CS. Por otra parte, el pH ruminal del tratamiento CS fue superior a MZ y se mantuvo siempre por encima de pH 5,8, valor umbral identificado por de Veth y Kolver (2001) por debajo del cual la digestión de la fibra se ve afectada en raigrás fresco. En consecuencia, se podría hipotetizar que el mayor contenido de grasa en leche para CS no sólo se debería a un mayor consumo de los precursores sino también a un mejor ambiente ruminal que facilita la digestión de la fibra. El reemplazo de carbohidratos estructurales, como la celulosa y hemicelulosa presentes en la cascarilla, por no-estructurales como el almidón del grano de maíz, genera un cambio en la producción de los AGV, desde acético a propiónico a través del desarrollo de los microorganismos que fermentan el almidón (Wanapat et al., 2015). Esto explicaría la menor relación acético:propiónico observada en el tratamiento MZ (2,58 vs. 3,97), coincidiendo con otros trabajos en los cuales las dietas fueron suplementadas con CS en reemplazo de maíz (Pantoja et al., 1994; Mansfield y Stern, 1994; Elliott et al., 1995; Ipharraguerre et al. 2002b).

Con respecto a la concentración de ácido butírico, fue superior en las ovejas que consumían grano de maíz. Ipharraguerre et al. (2002b) indican que la inclusión de mayor

cantidad de cascarilla en la dieta de vacas lecheras resulta en menores concentraciones de butírico, al igual que lo observado por Mansfield y Stern (1994) y Elliott et al. (1995).

El N-NH_3 mostró diferencias entre dietas ($P < 0,05$) y según el momento del día ($P < 0,01$). En la figura 3 pueden verse las variaciones diurnas de las concentraciones N-NH_3 . A lo largo de todo el día, los niveles de N-NH_3 del tratamiento CS se mantuvieron por encima del tratamiento MZ siendo máximas cerca de las 16:00hs, 4 horas después del suministro del alimento y registrándose los valores mínimos a las 04:00hs en ambos tratamientos. Sin embargo, el descenso del N-NH_3 en la dieta MZ es más marcado, posiblemente como resultado de una mayor captación del N por parte de las bacterias.

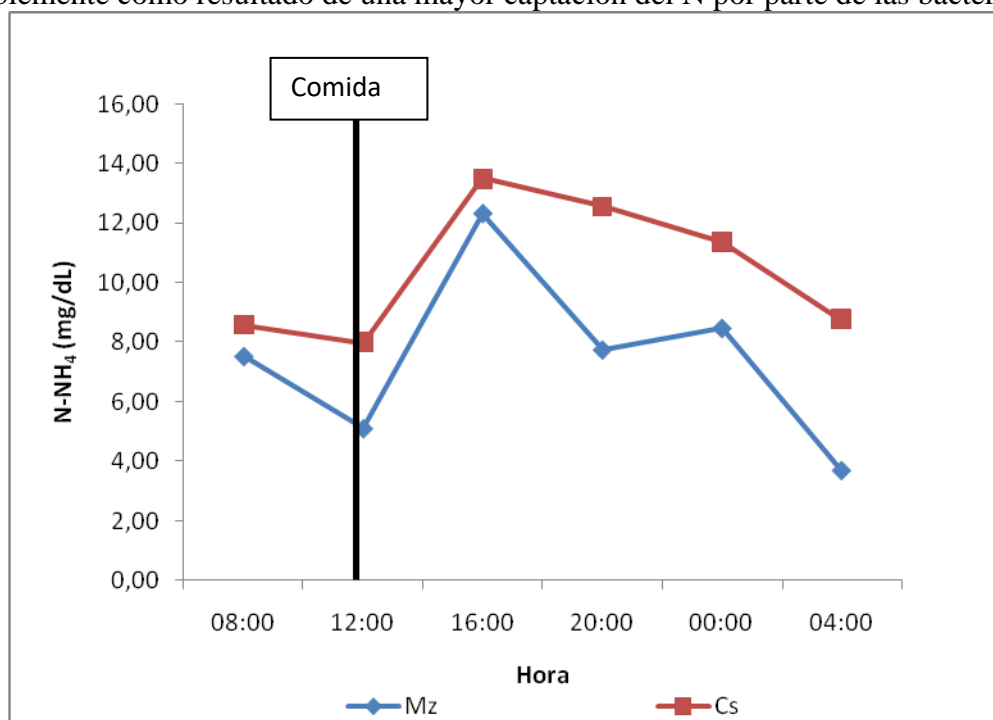


Figura 3. Efecto de la suplementación con MZ o CS sobre la dinámica diaria del N-NH_3 . No hubo interacción tratamiento*hora ($P > 0.05$).

Las bacterias captan N del pool de amoníaco del rumen para acoplarlo con cuerpos carbonados y así poder crecer y sintetizar proteína microbiana (Church, 1993). La dieta MZ presumiblemente genera mayor cantidad de esqueletos carbonados, debido a la mayor fermentabilidad del almidón en comparación con los carbohidratos estructurales de la cascarilla, que están rápidamente disponibles para unirse al N del amoníaco y formar parte de la proteína microbiana. Si bien la concentración de N-NH_3 es menor en las ovejas que consumían MZ respecto de aquellas que consumieron la dieta CS, los valores son bajos en ambos tratamientos, lo que indicaría que existe una buena captación de N amoniacal tanto para la suplementación con maíz como con cascarilla. Esto refuerza el valor de la cascarilla como suplemento fibroso de alta fermentabilidad y, en consecuencia, dador de esqueletos carbonados para la síntesis de proteína microbiana. Estudios similares, algunos ya citados, muestran mayores concentraciones de N-NH_3 para los animales a los cuales se les incluyó CS en sus dietas respecto de aquellos que consumieron MZ (Faulkner et al., 1994; Ipharraguerre et al., 2002b; Nguyen et al., 2008; Orr et al., 2008).

La mayor captación de N-NH_3 a nivel ruminal explica por qué la suplementación energética suele incrementar el porcentaje de proteína de la leche, aún siendo este componente menos variable que el porcentaje de grasa. En el presente trabajo no se encontraron diferencias entre suplementos respecto del porcentaje de proteína (Cuadro 11). En general, la suplementación en pastoreo con fuentes de energía rápidamente

disponibles como el grano de maíz aumenta el contenido de proteína de la leche (Wilkins et al., 1994; Sayers, 1999; Reis y Combs, 2000b; Valentine et al., 2000; Bargo et al., 2002a). En contraste con la mayor parte de la literatura, y en concordancia con nuestros resultados, Ipharraguerre et al. (2002a) encontraron que la inclusión de CS al 40% el contenido de proteína fue similar con respecto a aquellos tratamientos con MZ, del mismo modo que MacGregor y Owen (1976) no habían observado diferencias en proteína láctea con la inclusión de un 28 % de CS en reemplazo del MZ.

Una buena captación de N-NH₃ a nivel ruminal no sólo tiene implicancias productivas en relación a la síntesis de proteína en leche, sino que también debe tenerse en cuenta que el N dietario que no es convertido a proteína láctea tiene efectos negativos sobre el animal y el ambiente. Pacheco et al. (2008) señalan que los excesos de N están asociados a un mayor gasto energético por parte del animal para conversión de amoníaco en urea a nivel hepático, a problemas reproductivos y a la contaminación ambiental, principalmente, por un exceso en la excreción urinaria de N, entre otros factores.

3.3.4 Perfil de ácidos grasos en rumen.

De acuerdo con el Cuadro 13 que muestra el perfil de AG en rumen, no se detectaron diferencias entre tratamientos para C12:0, C13:1, C14:0, C14:1, C16:0, C16:2, C16:3, C18:0, *trans-9* C18:1, *cis-11* C18:1, C20:5 y C22:6 ($P > 0,05$), no obstante el C15:0, *cis-9* C16:1 y C17:0 resultaron significativamente superiores en la dieta CS ($P < 0,05$). Las concentraciones de ac. vaccénico (*trans-11* C18:1) y el oleico (*cis-9* C18:1) resultaron superiores en MZ respecto de CS (4,83 vs. 2,93; 0,81 vs. 0,38g/100g FA; $P < 0,05$) en contraste con el linolenico (*cis-9*, *cis-12*, *cis-15* C18:3), C18:4 y araquidónico (C20:4) (1,26 vs.1,79, 0,02 vs. 0,07 y 0,43 vs. 0,57g/100g FA). Contrario a lo reportado en vacas, los contenidos de ac. linoleico y ruménico (*cis-9*, *trans-11* C18:2) tendieron a ser mayores en MZ (4,21 vs.2,66 y 0,15 vs. 0,04g/100g FA; $P < 0,10$), posiblemente debido a que el consumo de linoleico resultó superior en esta dieta, siendo de 1,62g/Kg PV^{0.75} vs. 0,86g/Kg PV^{0.75} para CS ($P < 0,05$). Por otro lado, se observó una tendencia a mayor concentración del isómero *trans-10*, *cis-12* C18:2 en la dieta CS (0,14 vs. 0,09 g/100g FA) ($P < 0,10$). A pesar de las tendencias observadas en rumen, no se encontraron diferencias tanto para el *cis-9*, *trans-11* C18:2 CLA o el *trans-10*, *cis-12* C18:2 CLA en leche ($P < 0,05$), tal como se reportó en el capítulo 2.

En un ensayo con vacas lecheras, Boeckaert et al. (2008) demostraron que la BH del C18:2n6 y del C18:3n3 era inhibida por la suplementación con algas, resultando en incrementos en la concentración de diversos intermediarios en rumen y en la disminución de la producción de esteárico (C18:0). Las dietas suplementadas producían 6 y 20 veces más *trans-11* y *trans-10*, respectivamente, en comparación con la dieta control. Estos autores señalaron que la suplementación producía cambios en la comunidad bacteriana, especialmente los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, relacionadas con el proceso de BH.

Vasta et al. (2010) reportaron cambios en los perfiles de ácidos grasos en rumen de corderos suplementados con taninos, obteniendo mayor concentración de vaccénico y atribuyendo estos resultados a cambios producidos en la composición de las comunidades microbianas también asociadas a la BH. En las dietas suplementadas se incrementó la población de *Butyrivibrio fibrisolvens*, que convierte *cis-9*, *cis-12* C18:2 en *cis-9*, *trans-11* C18:2 CLA y luego en *trans-11* C18:1, y disminuyó la población de *Butyrivibrio proteoclasticus*, que hidrogena, finalmente, el vaccénico a esteárico (C18:0).

Existen diferentes perfiles de AG en rumen en respuesta a la suplementación, ya sea con concentrados energéticos, lípidos, aditivos e, inclusive, comparando entre suplementos del mismo grupo, como en el trabajo de Loo et al. (2002), quienes evaluaron distintos tipos de aceites sobre la dieta de vacas lecheras. Encontraron diferencias para los tres ácidos grasos esenciales, C18:1, C18:2 y C18:3 y para diferentes intermediarios de la BH, como el *trans-11* C18:1. Varios isómeros CLA (*cis-9*, *trans-11*) resultaron superiores en la dieta suplementada con aceite de soja en comparación con aceite de colza, la cual resultó en mayores contenidos de *trans-10* C18:1.

Cuadro 13. Perfil de ácidos grasos en licor ruminal de ovejas suplementadas con fuentes contrastantes de carbohidratos.

FA (g/100g FAs)	Tratamiento		Significancia ³	
	MZ ¹	CS	EEM ²	P – value
C12:0	0,22	0,21	0,03	0,8138
C13:0	0,16	0,18	0,02	0,5403
C14:0	1,47	2,15	0,68	0,4941
C14:1	0,19	0,23	0,05	0,6267
C15:0	0,58 ^a	1,02 ^b	0,04	0,0001
C16:0	10,44	11,09	0,86	0,5992
Cis-9 C16:1	0,19 ^a	0,35 ^b	0,02	0,0008
C17:0	0,41 ^a	0,61 ^b	0,02	0,0001
C16:2 n-4	0,06	0,07	0,01	0,5331
C18:0	37,04	36,53	4,42	0,9367
Trans-9 C18:1	7,16	6,59	0,97	0,6896
Trans-11 C18:1	4,83 ^b	2,93 ^a	0,6	0,0485
Cis-9 C18:1	0,81 ^b	0,38 ^a	0,1	0,011
Cis-11 C18:1	0,51	0,39	0,07	0,2235
C18:2 n-6	4,21	2,66	0,52	0,0607
C18:3 n-3	1,26 ^a	1,79 ^b	0,09	0,0026
Cis-9, trans-11 C18:2	0,15	0,04	0,04	0,0641
Trans-10, cis-12 C18:2	0,09	0,14	0,02	0,0623
C20:1 n-9	0,07	0,13	0,02	0,0694
C20:4 n-6	0,43 ^a	0,57 ^b	0,03	0,0086
C22:5 n-3	0,04	0,08	0,01	0,0571
C22:6 n-3	0,11	0,18	0,04	0,2696

^{a-b} Superíndices en una misma fila indican diferencias entre medias.

¹ MZ= grano de maíz; CS = cascarilla de soja; ²Error estándar de la media; FA=fatty acids; ³Diferencias significativas: P < 0,05; Diferencias altamente significativas: P < 0,01; Tendencia: P < 0,1

Sorpresivamente, el isómero *trans-10*, *cis-12* CLA, vinculado al MFD, no difirió entre suplementos lipídicos. Estos autores concluyen que los patrones de formación de isómeros C18:1 y C18:2 durante la BH ruminal dependen en gran medida del perfil de AGI de la dieta. En nuestro estudio hemos observado que si bien la dieta CS presentaba mayores contenidos en C18:2 y C18:3, algunos de los principales intermediarios de la BH fueron superiores en la dieta MZ. Las mayores concentraciones de *cis-9*, *trans-11* C18:2 CLA y *trans-11* C18:1 en el líquido ruminal del tratamiento MZ, contrario a lo esperado de acuerdo con la extensa literatura revisada, evidencian que la respuesta del proceso de BH a la suplementación es sumamente compleja. Diversos autores en ensayos con ovejas

lecheras (Boeckert et al., 2009; Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2010; Toral et al., 2012) han dirigido sus investigaciones hacia la suplementación con aceites y algas marinas, obteniendo gran variabilidad en los perfiles de AG en rumen. En todos los casos los autores señalan que los cambios en los pasos metabólicos de la BH se relacionan a cambios en las abundancias y frecuencias relativas de ciertos grupos de bacterias como las del género *Butyrivibrio*, la familia *Lachnospiraceae* y *Quinella*.

Posiblemente los concentrados suministrados a las ovejas podrían alterar los pasos normales del proceso de BH de un modo distinto a lo encontrado en la vaca. Dado que la información disponible en pequeños rumiantes es escasa en relación a los trabajos en vacas lecheras, las conclusiones deben tomarse con cierta precaución (Chilliard et al., 2003). Estos resultados podrían considerarse como base para avanzar en futuras investigaciones que logren describir mejor las vías metabólicas de la BH y el microbioma asociado al mismo en ovejas lecheras.

3.4. Conclusiones.

La suplementación con CS resultó en mayor producción ruminal de ácido acético y pH significativamente superior respecto de la dieta MZ como resultado, posiblemente, de una mayor degradación de fibra. Esto se tradujo en un mayor porcentaje de grasa butirosa, sin haberse observado diferencias en producción de leche.

Llamativamente, la concentración de ac. vaccénico (*trans-11* C18:1) fue notablemente superior en el licor ruminal de las ovejas suplementadas con grano de maíz, la cual tuvo, a su vez, una tendencia hacia mayores contenidos de ruménico (*cis-9, trans-11* C18:2) probablemente por el mayor consumo de AL. En contraste, la dieta CS tendió a mayor concentración del isómero *trans-10, cis-12* C18:2. Dado que estos resultados son contrarios a los ampliamente reportados en vacas lecheras, es posible que los mecanismos que operan en la BH no sean compartidos igualmente en todos los rumiantes.

CAPITULO 4.

Suplementación energética contrastante y microbioma ruminal.

4.1. Introducción.

Los rumiantes son definidos por la complejidad de su aparato digestivo, el cual les permite obtener energía de la degradación de la fibra y transformar sus productos finales en fuentes de alimento para la nutrición humana, principalmente proteína (Elsik et al., 2009). Si bien el rumen es el principal órgano responsable de la degradación del alimento, la fermentación no es realmente realizada por los mismos rumiantes. En este contexto, los animales rumiantes resultan ser los huéspedes del complejo enzimático involucrado, fundamentalmente, en la digestión de polisacáridos al proveer de un medio adecuado a los verdaderos fermentadores: los microorganismos.

El microbioma ruminal está compuesto por un consorcio de bacterias anaerobias, archaeas, protozoos y hongos, los cuales desempeñan distintos roles en la digestión de carbohidratos estructurales y no-estructurales, en la degradación y síntesis proteica, reciclaje de nitrógeno, lipólisis y BH (Chaucheyras-Durand y Ossa, 2014). En los últimos años, las tecnologías basadas en biología molecular han contribuido a grandes avances en el conocimiento sobre comunidades microbianas del rumen por medio del análisis filogenético de secuencias de la subunidad 16S del rRNA, recuperadas a partir de librerías clonadas por amplificación directa con PCR (Edwards et al., 2004; Deng et al., 2008).

Tal como lo reportado por Kim et al. (2011), la abundancia de algunas bacterias no-cultivadas, cuantificadas por qPCR, resulta similar a la abundancia de las principales bacterias que sí fueron cultivadas, lo cual sugiere que este grupo de bacterias no-cultivadas podría tener también un importante rol en la degradación de los alimentos. Un dato interesante, es que solo el 1%, aproximadamente, del total de bacterias del rumen es cultivable.

El advenimiento de las tecnologías “ómicas” basadas en DNA y RNA (Chaucheyras-Durand y Ossa, 2014), y los avances en el campo de la “Secuenciación de última generación” o NGS (“Next generation sequencing”, según sigla en inglés), indicada por Buermans y Den Dunnen (2014) como “Del Genoma a la Función”, han permitido grandes progresos en estudios de microbioma, especialmente al identificar microorganismos no-cultivables. Desde los primeros descubrimientos logrados a partir de cultivos *in vitro* (técnicas tradicionales) hasta la NGS, la comprensión del microbioma ruminal ha conducido a modular la dieta en pos de manipular las comunidades microbianas con el fin último de hacer más eficiente la utilización del alimento y obtención de energía por parte del animal.

Kim et al. (2011) realizaron un meta-análisis de todas las secuencias genómicas conservadas del 16S rRNA en la base de datos del “Ribosomal Database Project” hasta el año 2010. En su trabajo reportaron cerca de 3500 secuencias pertenecientes al reino Archaea y 13500 pertenecientes al reino Bacteria e indicaron una diversidad estimada de más de 1500 y 7000 especies distintas de archaeas y bacterias, respectivamente. De acuerdo con esta revisión, los géneros predominantes de bacterias están representados por *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus*, *Succinivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Mogibacterium* (*Clostridia*), *Streptococci* (*Basili*) y *Prevotella* (*Bacteroidia*).

Por otro lado, algunos autores sugieren que existe una comunidad dominante en el rumen o “core microbiome” como se lo menciona comúnmente en la bibliografía (Jami y Mizrahi, 2012; Petri et al., 2013; Henderson et al., 2015). Sin embargo, la composición de este microbioma puede verse afectada por diversos factores atribuidos, principalmente, a la dieta y al animal huésped (tanto en términos de individuo como de especie (Chaucheyras-Durand et al., 2012, Petri et al., 2013; Henderson et al., 2015). Muchas

bacterias del rumen son específicas de ciertos sustratos de modo que leves cambios en la composición de la dieta pueden resultar de gran impacto sobre las comunidades microbianas (Jouany, 1991).

Dado que los rumiantes producen recursos alimenticios para el consumo humano a través de la actividad enzimática del rumen, existe un fuerte interés en el área de nutrición de rumiantes por evaluar los efectos de la dieta sobre la composición microbiana y la calidad del producto final. Existe poca información acerca de las comunidades microbianas relacionadas con dietas que promueven la mejora en la calidad nutracéutica de la leche, especialmente dietas con suplementación energética contrastante.

Zened et al. (2013) indicaron que un elevado contenido de almidón en la dieta de vacas lecheras genera una alteración en el ambiente ruminal y, en consecuencia, un nuevo equilibrio en las poblaciones microbianas del rumen, modulando el proceso de BH en favor de las bacterias productoras de isómeros *trans-10* a expensas de aquellas productoras de *trans-11* o a una modificación de la actividad bacteriana. De igual forma, Toral et al. (2012) mencionan un cambio en los pasos de la BH hacia mayor producción ruminal de isómeros *trans-10* C18:1 a expensas de *trans-11* C18:1 para altos niveles de suplementación lipídica con aceite de girasol y algas en ovejas lecheras, también asociados a cambios en las poblaciones de microorganismos. La evidencia indica que las principales especies bacterianas involucradas en el proceso de BH pertenecen al grupo *Butyrivibrio*, en el cual se incluyen los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* y bacterias filogenéticamente relacionadas (Paillard et al., 2007a y Devillard et al., 2007, citados por Belenger et al., 2010). De acuerdo con Klieve et al. (2003), la bacteria más conocida como productora de AG *trans-11*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, es altamente sensible a dietas con alto contenido de almidón. Por otro lado, fueron detectados grupos bacterianos de variada frecuencia relativa, involucrados potencialmente en uno o más pasos metabólicos de la BH, como diversas cepas de *Lachnospiraceae* o *Quinella* (Toral et al., 2012).

Vinculado a estos cambios, se asocia el MFD, causado por la inhibición de los isómeros *trans-10* (Griinari et al., 1998; Loores et al., 2005a; Shingfield et al., 2009) sobre la síntesis de grasa en glándula mamaria. Más específicamente, el MFD ha sido vinculado con el isómero *trans-10*, *cis-12* CLA (Baumgard et al., 2000; Bauman y Griinari, 2001), el cual también ha sido relacionado con modificaciones en la estructura de las comunidades bacterianas a nivel ruminal (Weimer et al., 2010). El MFD fue mencionado también en ovejas (Papadopoulos et al., 2002; Reynolds et al., 2006 citados por Bichi et al., 2013) y observado por Toral et al. (2010b) en dietas con suplementación lipídica con aceite de girasol y algas. Estos autores atribuyeron la reducción en el contenido de grasa de la leche al agregado de algas al suplemento.

Los resultados observados en los perfiles de AG de la leche han presentando diferencias debidas a la especie animal y a la dieta, lo que conduciría a la necesidad de mayores investigaciones en el área para caracterizar y explicar mejor dichas diferencias. Adicionalmente, los estudios sobre microbioma ruminal son limitados en ovejas (Belenger et al., 2010; Dantas López, 2015) en comparación con vacas (Jami et al., 2014; McCabe, 2015; Menezes, 2011; Petri et al., 2013; Zened et al., 2013).

En los capítulos previos (II y III) se discutieron aspectos vinculados a la performance, ambiente ruminal y calidad de leche, tanto en composición química como perfil de ácidos grasos. Es posible que así como se observaron diferencias en estas variables según el tipo de suplemento, existan diferencias en la diversidad y composición microbioma ruminal.

El objetivo de este capítulo es presentar y analizar la información obtenida a partir de los estudios de microbioma por medio de la secuenciación del 16S rRNA utilizando la

plataforma Illumina MiSeq, para dilucidar las posibles relaciones entre la comunidad microbiana del rumen y la respuesta productiva.

4.2. Materiales y métodos:

El presente estudio fue realizado a partir de 18 muestras de licor ruminal tomadas de las 6 ovejas del experimento descrito en el capítulo 3 (ver sección 3.2.1. Animales y diseño experimental en Materiales y Métodos). Los análisis de microbioma fueron desarrollados en el Biocience Laboratory of the Animal and Grassland Research and Innovation Centre, Teagasc Grange, República de Irlanda.

4.2.1. Muestreo de contenido ruminal.

Dos muestras de contenido ruminal mixto (fase sólida y líquida) fueron extraídas del saco ventral y dorsal cuatro horas después del suministro del alimento, es decir, en el horario de muestreo de las 16:00hs. Luego se realizó un pool para obtener una muestra única por animal. Las muestras se colocaron inmediatamente en tubos Falcon de 50mL y fueron llevadas al laboratorio para su almacenaje a -80°C. Cada muestra representativa de 50g de contenido ruminal mixto fue molida y homogeneizada mediante mortero y bajo nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo de finas partículas congeladas. Luego se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta comenzar con el procedimiento de extracción de DNA. Para tal fin, se utilizaron submuestras de 300mg de polvo de contenido ruminal congelado.

4.2.2. Extracción de DNA.

Se extrajo DNA genómico siguiendo el procedimiento de Yu y Morrison (2004). La concentración de DNA recuperada se cuantificó por calentamiento de la muestra a 37°C durante dos minutos, mezclado suave y posterior lectura en Nanodrop 1000 spectrophotometer. La calidad del DNA fue evaluada mediante electroforesis a 120V durante 50min, con una corrida de 120ng de muestra en un gel de agarosa al 2%.

Una alícuota de 3µL de DNA extraído fue mezclada con el 5X DNA binding buffer blue (BIOLINE-37045) y descargada sobre un gel de agarosa al 2% en 0,5% de buffer Tris acetate-EDTA conteniendo GelRed (BIOTIUM). Se utiliza luego una alícuota de 5 µL de Hyperladder 100bp (BIOLINE – 33056). El DNA se visualizó mediante luz UV y la imagen se obtuvo con transiluminador UV. Luego, las muestras fueron diluidas hasta obtener una concentración final de DNA de 5ng/ µL para el análisis por PCR.

4.2.3. Preparación de la librería y secuenciación.

La región V4 del 16S rRNA del DNA de bacterias y archaeas (extraído de cada muestra de licor ruminal) se amplificó por PCR para generar 18 librerías de amplicones, utilizando los primers que se detallan a continuación y la enzima KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (2X) de BIOSYSTEMS (Wilmington, Massachusetts, USA).

Forward primer 5':

TMZTMZGCAGMZTCAGATGTGTATAAGAGACAG
[GTGCCAGCMGCMZMZGTAA]

Reverse primer 5':

GTCTMZTGGGCTMZGAGATGTGTATAAGAGACAG
[GGACTACHVGGGTWTCTAAT]

Las condiciones de la PCR fueron: 3 minutos a 95°C, luego 27 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. En una segunda PCR, se adhirieron los índices Nextera XT (Nextera XT indexing kit - Illumina), utilizando la enzima KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (2X). Las condiciones de esta segunda PCR fueron: 3 minutos a 95°C, luego 8 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los amplicones se purificaron empleando el QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego de este paso, el DNA se cuantificó nuevamente con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 y su calidad final fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Iguales concentraciones de las 18 librerías indexadas se combinaron en un pool y se realizó una purificación de fragmento comenzando por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Agarose HIREs grade) a una banda correspondiente a un tamaño aproximado de 450 pares de bases. Esa banda fue extraída utilizando bisturí estéril y luego la purificación de la porción de gel extraída se realizó por medio del kit “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania). La librería purificada se analizó en Nanodrop 1000 e inmediatamente se cuantificó por qPCR utilizando el kit “KAPA SYBR FAST Universal qPCR” con el Primer Mix para Illumina (Kapabiosystems).

Para la secuenciación se siguieron las instrucciones de la Guía “Illumina MiSeq library preparation guide” utilizando una muestra de 2nM del pool de librería.

Se combinaron 6 pM de la librería pool con 12,5 pM de librería control PhiX V3 (6:4 v/v) y se corrieron en “MiSeq 500 cycle version 2 reagent cartridge” (Illumina) en plataforma Illumina MiSeq para 500 ciclos de secuenciación.

4.2.4. Análisis de la secuenciación.

Los resultados obtenidos de la secuenciación se analizaron utilizando el programa QIIME, siguiendo lo descrito por Caporaso et al. (2011). Las unidades taxonómicas operacionales (“OTUs”, según sigla en inglés) se generaron a partir de un 97% de similaridad.

4.2.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SAS (SAS Institute, 2008). Los resultados fueron analizados por ANVA de acuerdo al diseño experimental empleado en el experimento del capítulo 3 (*cross-over*) utilizando un procedimiento de modelos mixtos con medidas repetidas siendo el animal el factor aleatorio. Las medias fueron comparadas por Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \text{trat}_i + \text{período}_j + \text{trat}_i \times \text{período}_j + \text{Error}_{ij}$$

donde: μ es la media general, trat_i es el efecto del tratamiento (MZ y CS), período_j representa el período del *cross-over*, $\text{trat}_i \times \text{período}_j$ es la interacción, y Error_{ij} es el error experimental. Las diferencias significativas fueron declaradas a $P < 0,05$ y las tendencias discutidas a $P < 0,10$.

4.3. Resultados y discusión.

4.3.1. OTUs, riqueza y diversidad microbiana.

La secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA de las 18 muestras de licor ruminal, provenientes de 6 ovejas lecheras (en tres períodos) resultó en un promedio de 122.735 lecturas de calidad y, luego de la remoción de secuencias quimera, en 119.358 secuencias con un tamaño medio de 292 pares de bases (bp) (Cuadro 14). Similares resultados fueron obtenidos por Jami y Mizrahi (2012), con un total de 162.000 lecturas de calidad en 16 vacas Holstein Friesian en lactancia, no obstante el número puede variar ampliamente. Como ejemplo de esta variabilidad, el trabajo de Dantas López et al. (2015) obtuvo un total de 425.428 secuencias de calidad (58bp) en cuatro ovinos macho mientras que Han et al. (2015) obtuvo un total de 256.868 (394bp) en tres cabras lecheras. Si bien es importante considerar el número de secuencias de calidad obtenidas, se debe analizar si esta cantidad es adecuada para un completo análisis de microbioma. Esto puede verse con las curvas de rarefacción (Fig. 5).

Cuadro 14. Número de lecturas por muestra luego de la secuenciación del amplicon de la región V4 del gen 16S rRNA

Muestra ^a	Pares de lecturas	Lecturas recortadas y fusionadas por calidad	% Supervivencia de lecturas	Lecturas luego de remoción de quimeras
1	215931	134507	62,29	130499
2	142815	99956	69,99	97375
3	255443	187746	73,50	182846
4	126117	80275	63,65	78412
5	193655	121007	62,49	117513
6	208512	140515	67,39	135068
7	201097	138778	69,01	135331
8	152163	70820	46,54	68849
9	211294	146312	69,25	142318
10	175441	116904	66,63	113782
11	137087	100044	72,98	97195
12	200916	146572	72,95	143504
13	134245	81688	60,85	79234
14	221161	149241	67,48	145065
15	206850	132955	64,28	129580
16	204888	135718	66,24	131984
17	129793	90636	69,83	87822
18	208528	135556	65,01	132073

^a Muestras 1-6 pertenecen al periodo I; 7-12 pertenecen al periodo II; 13-18 pertenecen al periodo III. Muestras 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15 y 17 corresponden al tratamiento MZ.

Las curvas de rarefacción de cada muestra se acercaron al punto de saturación o “plateau” más allá de las 30.000 secuencias por muestra (Fig. 4), indicando que el número de secuencias obtenidas fue suficiente para obtener una buena descripción de la composición bacteriana de cada tratamiento. Aún obteniendo menor número de secuencias que en los estudios de Dantas López et al. (2015) y Han et al. (2015), el total de OTUs detectadas en nuestro trabajo resultó casi del doble respecto de dichos trabajos.

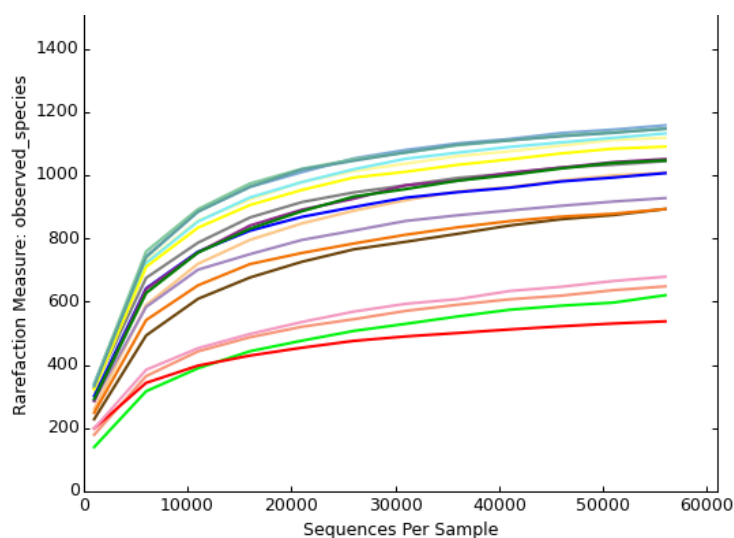


Figura 4. Curvas de rarefacción de las OTUs generadas a partir de un 97% de similitud para las 18 muestras.

El análisis de metagenómica detectó un total de 11.356 OTUs, de las cuales 209 OTUs fueron asignadas al reino Archaea y 10.222 OTUs al reino Bacteria, no existiendo diferencias entre dietas tanto para el total de archaeas ($P=0,68$) como de bacterias ($P=0,58$) (Figura 5).

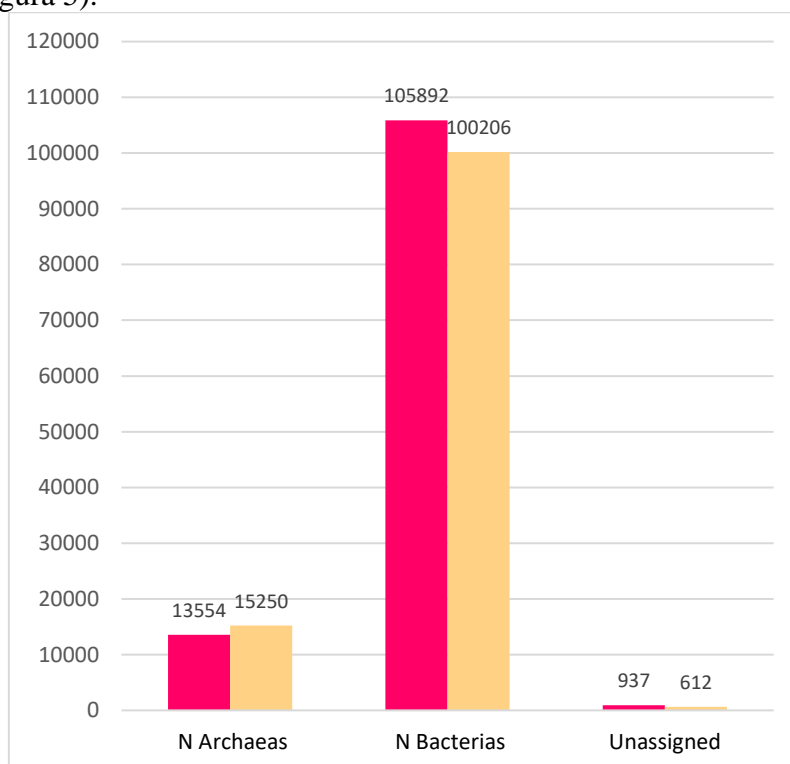


Figura 5. Total de microorganismos (N) a nivel de reino (Archaea y Bacteria) para las dietas CS (■) y MZ (■).

Sin embargo, la riqueza, estimada por el índice Chao1 (Chao y Lee, 1992) y ACE (abundance-based coverage estimator), y la alpha-diversidad, evaluada utilizando el índice de Shannon (1948) y Simpson (1949), muestran diferencias entre dietas tal como

puede observarse en la Figura 6 y Cuadro 15. Tanto la riqueza como la diversidad resultaron superiores en la dieta CS, presumiblemente debido a la mayor cantidad de sustratos o biomoléculas distintas que aporta la cascarilla de soja con respecto al grano de maíz. La pared celular de la cascarilla posee una alta proporción de galactomananos; los principales azúcares que la componen son la galactosa, glucosa (celulosa), arabinosa y distintos ácidos urónicos, lo cual es indicativo de mayor diversidad de las pectinas dentro de la estructura de la pared de cascarilla de soja en comparación con otras paredes celulares (Huisman et al., 1998). En el grano de maíz, abunda el almidón y, en menores cantidades, celulosa, arabinoxylanos y β -glucanos ubicados en la pared (Knudsen, 2014).

La mayor cantidad de sustratos distintos explicaría la existencia de una población bacteriana más diversa para cubrir la mayor actividad enzimática para degradarlos. Es realmente difícil encontrar índices parecidos a lo largo de la bibliografía, ya que la diversidad del microbioma ruminal está íntimamente ligada con el individuo y con la dieta también, como principales factores (McCann et al., 2014).

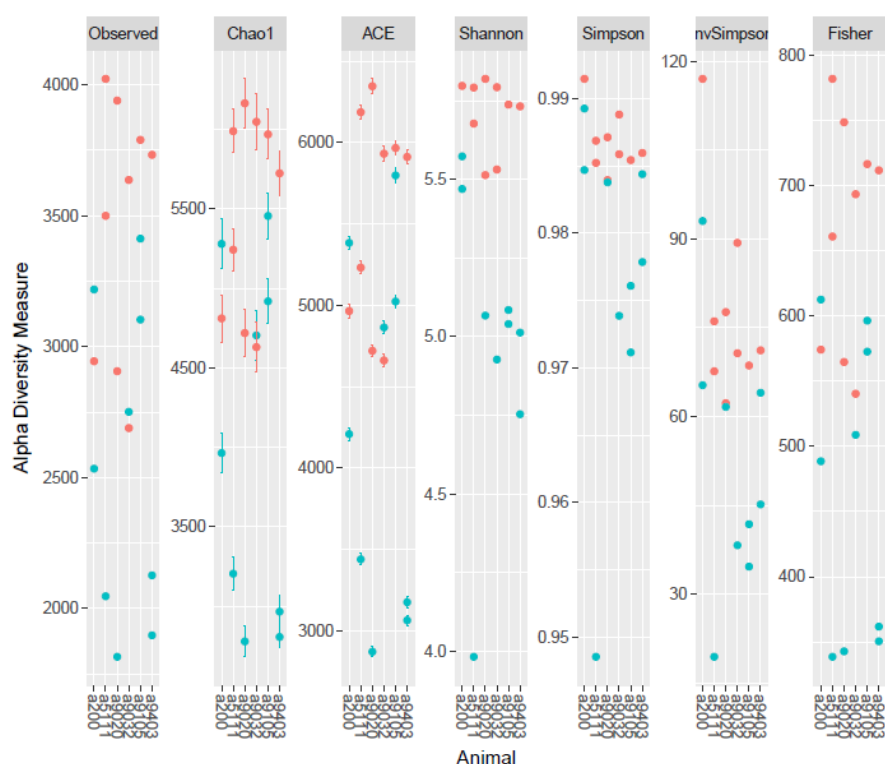


Figura 6. Índices de riqueza (Chao 1, ACE) y diversidad (Shannon, Simpson, Fisher) para cada una de las dietas MZ (●) y CS (●) y por animal (200, 5111, 9020, 9032, 9105, 9403).

Cuadro 15. Estimadores de riqueza y diversidad de la librería genómica 16S rRNA del licor de rumen de oveja a partir del análisis de secuenciación.

Muestra ID	Observado	Chao	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson	Fisher
X01	2127	4703 (4549-4703)	4863 (4904-4822)	5,01	0,98	64,01	361,71
X02	2906	2967 (2865-2967)	3175 (3209-3141)	5,51	0,98	62,24	564,72
X03	3412	6046 (5868-6046)	5931 (5975-5887)	5,08	0,98	41,82	596,48
X04	2689	4629 (4471-4629)	4661 (4701-4620)	5,53	0,99	89,32	540,36
X05	3218	2808 (2742-2808)	3064 (3095-3033)	5,57	0,99	93,00	612,67
X06	4022	5722 (5580-5722)	5911 (5955-5867)	5,79	0,99	76,08	782,02

X07	3732	4810 (4662-4810)	4964 (5005-4923)	5,73	0,99	71,17	711,82
X08	1816	6162 (6008-6162)	6345 (6391-6300)	5,07	0,98	61,62	342,76
X09	3789	3964 (3842-3964)	4208 (4247-4170)	5,74	0,99	68,62	716,63
X10	2751	4718 (4570-4718)	4720 (4759-4681)	4,93	0,97	38,27	508,86
X11	2944	5279 (5124-5279)	5383 (5425-5340)	5,80	0,99	117,01	574,21
X12	2047	2780 (2683-2780)	2871 (2902-2840)	3,98	0,95	19,44	338,55
X13	1898	3205 (3099-3205)	3439 (3474-3404)	4,75	0,98	45,16	350,43
X14	3939	4918 (4776-4918)	5022 (5063-4982)	5,82	0,99	77,63	748,74
X15	3103	5242 (5108-5242)	5231 (5271-5191)	5,04	0,97	34,66	572,67
X16	3636	5454 (5307-5454)	5797 (5843-5752)	5,79	0,99	70,68	693,51
X17	2534	5987 (5852-5987)	6185 (6230-6141)	5,47	0,98	65,30	488,57
X18	3499	5967 (5810-5967)	5966 (6009-5922)	5,68	0,99	67,64	661,00

Sample ID = Muestras, X1-X6 pertenecen al periodo I; X7-X12 corresponden al periodo II; X13-X18 corresponden al periodo III. Muestras X1, X3, X5, X8, X10, X12, X13, X15 y X17 corresponden al tratamiento CS. Estimadores de riqueza (Chao y ACE, promedio y rangos) y diversidad (Shannon, Simpson, InvSimpson, Fisher).

4.3.2. Caracterización a nivel de Phylum.

Se identificaron 20 *phyla* bacterianos en el microbioma; no obstante, siete de ellos fueron considerados como los principales, dada su abundancia relativa (RA). Los Firmicutes y Bacteroidetes resultaron los más abundantes, seguidos por Spirochaetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria y Fibrobacteres (Figura 7). Si bien no hubo efecto del suplemento energético sobre el recuento total de archaeas ni de bacterias, la comunidad microbiana fue afectada por el tratamiento dado que se detectaron diferencias en las RA de los principales phylum ($P < 0,05$). Esto significa que la dieta tuvo más efecto sobre la estructura del microbioma que sobre la cantidad de microorganismos detectados.

En el tratamiento CS, RA de 54,86% y 34,81% fueron atribuidos a Firmicutes y Bacteroidetes, respectivamente, seguidos por RA de 1,24% correspondiente a Spirochaetes y 0,69% a Proteobacteria. En la dieta MZ, la RA de Firmicutes resultó superior con respecto a la dieta CS, alcanzando un 69%, aproximadamente 14 puntos porcentuales de diferencia.

	CS	MZ
ACTINOBACTERIA	0,56	1,01
BACTEROIDETES	34,81	21,15
CYANOBACTERIAS	0,67	0,50
FIBROBACTERES	0,45	0,43
FIRMICUTES	54,86	69,00
PROTEOBACTERIA	0,69	1,11
SPIROCHAETES	1,24	1,07
OTHERS	6,58	5,88

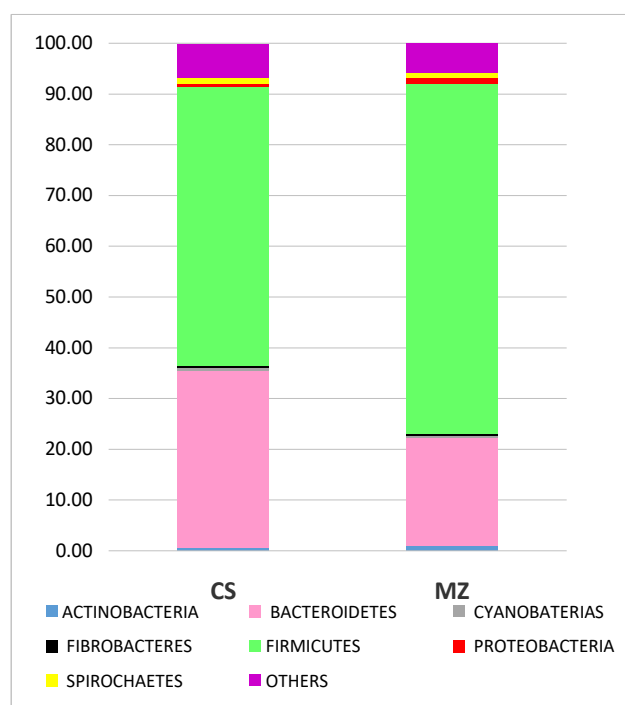


Figura 7. Estructura de la comunidad bacteriana del rumen a nivel de Phylum para las dos dietas: CS y MZ. El grafico de barras representa las RA de los *phyla* más abundantes y en el cuadro se muestran los valores respectivos de RA en porcentajes (%).

La mayor RA de Firmicutes en MZ posiblemente se obtuvo a expensas de la reducción en la proporción de Bacteroidetes, cuya RA fue de 21,15%, es decir, 13,66 puntos porcentuales menos que en CS. Esto podría estar sustentado por los datos revisados por Kim et al. (2011), quienes señalan que los phylum dominantes son los Firmicutes y Bacteroidetes con RA de 57,8% y 26,7%, respectivamente, asemejándose más a la dieta CS que MZ. Adicionalmente, los Spirochaetes también mostraron menor RA (1,07%) en MZ en comparación con CS, en contraste con Proteobacteria y Actinobacteria, cuyas RA casi duplican a las obtenidas en la dieta CS. Estos phylum constituyen porcentajes muy bajos en comparación con la sumatoria de Firmicutes y Bacteroidetes, alcanzando cerca del 80% del total de phylum (Pitta et al. 2010; Jami y Mizrahi 2012; Li et al. 2012).

La relación Firmicutes: Bacteroidetes (F: B) resultó significativamente superior en el tratamiento MZ (3,26) respecto de CS (1,58) ($P < 0,05$). La relación F:B podría estar asociada con la respuesta de algunas variables productivas. Un ejemplo de esto es la correlación positiva entre la relación F:B y el rendimiento de grasa en la leche ($R^2 = 0,51$) reportada por Jami et al. (2014) para vacas lecheras, contrario a los resultados del presente trabajo. Aquí, la regresión lineal entre la relación F:B y el porcentaje de grasa en leche resultó significativa ($P < 0,05$) pero negativa, aunque con un grado de ajuste inferior a lo reportado por Jami et al. ($R^2 = -0,39$) (Figura 8). Así, puede verse que a medida que aumenta la RA de los Firmicutes, la concentración de grasa butirosa tiende a bajar. Esto coincide con un estudio muy reciente que reporta una correlación positiva entre el MFD y la RA de los Firmicutes y las Actinobacterias (Pitta et al., 2018).

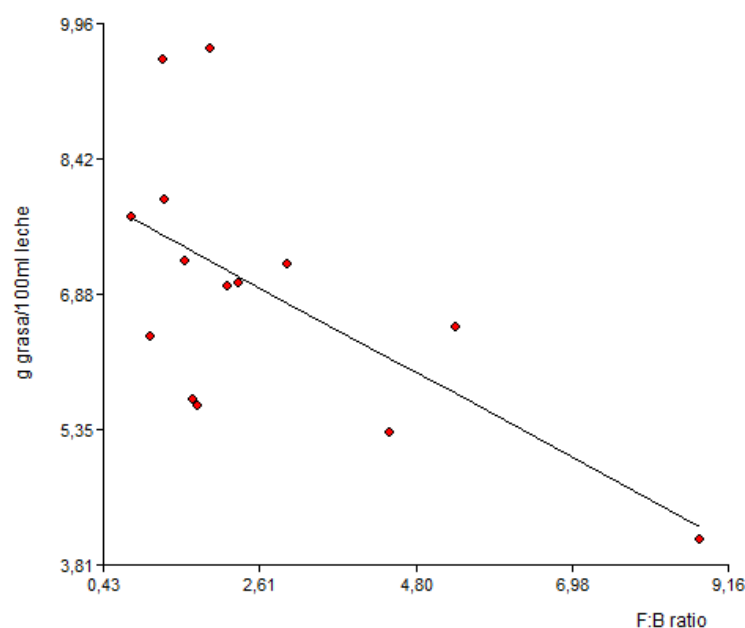


Figura 8. Correlación negativa entre la relación Firmicutes:Bacteroidetes (F:B ratio) y el contenido de grasa de la leche (g/100ml) para ambas dietas en conjunto.

4.3.3. Asignaciones taxonómicas y caracterización a nivel de género.

A partir de las 11.356 OTUs, se generaron 90 asignaciones taxonómicas. De estas 90, las más abundantes (consideradas por encima del 1% de RA) resultaron comunes a ambos tratamientos. Estas son: el orden Clostridiales (18,35% CS y 14,43% MZ), género *Prevotella* (16,13% y 12,39%), orden Bacteroidales (12,13% y 5,78%), género *Methanobrevibacter* (10,33% y 12,14%), familia Ruminococcaceae (9,18% y 7,66%), familia Lachnospiraceae (7,26% y 10,87%), y géneros *Butyrivibrio* (5,35% y 10,50%), *Ruminococcus* (19,3% y 11,01%), *Coprococcus* (1,18% y 1,92%), *Treponema* (1,05% y 0,84%) y *Methanosphaera* (1,05% y 0,72%).

El análisis estadístico mostró que de las 90 asignaciones, sólo 23 difirieron significativamente entre dietas ($P < 0,05$), 20 de las cuales resultaron superiores en CS con respecto a MZ (Figura 9). Llamativamente, los géneros *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* se vieron incrementados en la dieta MZ, seguidos por el género *Shuttleworthia*.

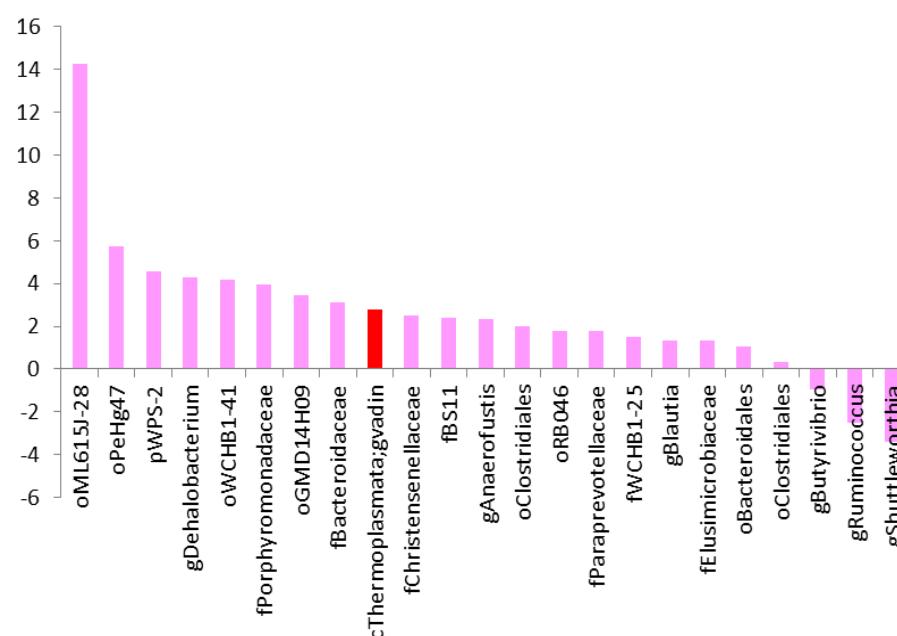


Figura 9. Relación CS/MZ expresada como “log₂ fold change” para las asignaciones taxonómicas que difirieron entre dietas ($P < 0.05$). La letra delante del nombre indica nivel filogenético: “p”, phylum; “o”, orden; “c”, clase; “f”, familia; “g”, género.

Si bien todos los grupos bacterianos que presentaron diferencias entre dietas pueden tener un importante rol en el metabolismo ruminal, discutiremos los géneros más relevantes desde el punto de vista nutricional, basándonos en dos criterios: la actividad vinculada a la degradación de la fibra y la relación con el proceso de BH (objeto de estudio en el presente trabajo).

La única Archaea diferente: VadinCA 11

Este género, perteneciente a la clase *Thermoplasmata*, resultó ser la única archaea que mostró diferencias entre dietas ($P < 0,05$) y se vio incrementada en las ovejas suplementadas con CS. Llamativamente, la principal metanógena, *Methanobrevibacter*, no mostró diferencias entre los tratamientos ($P > 0,05$).

El cluster C *Thermoplasmata* (Kemnitz et al., 2005) o Rumen Cluster C (RCC) (Janssen y Kirs, 2008) como se denomina actualmente, es un grupo abundante dentro del reino Archaea y ha sido identificado en rumiantes y también en intestino humano (Dridi et al., 2012). Su fuente principal de energía proviene de la metanogénesis a partir de metilaminas, aunque no está del todo probado que sean, además, hidrogenotróficos (Franzolin et al., 2012). Poulsen et al. (2013) mencionan dos aspectos importantes sobre RCC. Por un lado, la degradación de las metilaminas libera NH_4^+ que se incorporaría al pool de N ruminal, generando un aporte extra al rumiante. Y, por otro lado, RCC representaría un blanco potencial para las estrategias de mitigación de metano en vacas lecheras. De hecho, se ha reportado una correlación negativa entre el género de vadinCA 11 y la producción de metano (Zhao et al., 2018). Dado que no se cuantificó la producción de metano en cada una de las dietas, aun considerando el aporte de Zhao et al. (2018), no se puede asegurar que la dieta CS resulte menos metanogénica simplemente por presentar mayor RA de vadinCA 11. Adicionalmente, al analizar la posible asociación entre la RA de este género y la concentración de N- NH_3 ruminal en nuestro estudio, no se detectó correlación ($P=0,77$), aún existiendo diferencias entre dietas para el pool de N ruminal ($P < 0,05$) siendo de 7,62 mg/dl y 10,15 mg/dl para MZ y CS, respectivamente.

Ruminococcus.

De acuerdo con diversos autores, *Ruminococcus* y *Fibrobacter* representan los principales géneros celulolíticos del rumen (Weimer et al., 1996; Kong et al., 2010; Han et al., 2015), no obstante sus RA son bajas comparados con otros géneros, coincidiendo con trabajos previos en vacas lecheras y cabras donde se reportan porcentajes inferiores al 1% (Zened et al. 2013; Han et al, 2015). Contrario a lo esperado, la RA de *Ruminococcus* resultó superior en la dieta MZ respecto de CS ($P < 0,05$) (11,01% vs. 1,93%). Este género fue aislado por primera vez del rumen de bovino a partir de una tesis

doctoral publicada por Sijpesteijn en 1948, en la cual describe a *Ruminococcus flavefaciens* como “bacteria descomponedora de celulosa”. Años más tarde, Hungate (1957) reporta a *R. flavefaciens* y *albus* como bacterias celulolíticas. Estas dos especies comparten un 91% de similaridad de acuerdo con un estudio comparativo de genomas (La Reu et al., 2017), coexisten en la comunidad celulolítica del rumen y, a su vez, compiten por el mismo nicho ecológico (Chen et al., 2004). Además de que poseen estrategias diferentes para degradar celulosa, *R. albus* utiliza un rango más amplio de sustratos (Dassa et al., 2014; Christopherson et al., 2014).

Si bien la mayoría de las especies estudiadas son celulolíticas, un trabajo muy reciente indica que este género tiene una gran diversidad aún no explorada, con escaso conocimiento sobre los *Ruminococcus* no celulolíticos (La Reu et al., 2017). Han sido aisladas de intestino humano otras especies como, por ejemplo, *R. bromii*, con afinidad específica por los almidones resistentes (Ze et al., 2015) y *R. bicirculans*, con actividad hemicelulolítica, utilizando especialmente β -glucanos y xylanoglucanos, pero sin enzimas para degradar celulosa (Weigmann et al., 2014).

La Reu et al. (2017) por medio de un análisis filogenético de 56 genomas de *Ruminococcus* y géneros relacionados (rumiantes, humanos, otras especies) demuestran que las únicas dos enzimas compartidas por todos los genomas provienen de dos genes involucrados en la fosforilación del almidón, lo que sugeriría que la habilidad para degradar almidón proviene de un antepasado común a las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. En este sentido, es importante mencionar que el género *Ruminococcus* ha sido definido como polifilético, ya que posee miembros de esas dos familias (Rairy y Jensen, 1995) y más recientemente, algunos de sus miembros han sido reclasificados al género *Blautia* (Lawson y Firegold, 2015).

Debido a que los resultados de la secuenciación en el presente trabajo no permiten identificar a nivel de especie, no se puede aseverar si estamos en presencia de *R. flavefaciens* o *albus* o, posiblemente, alguna otra especie aún no identificada. Sin embargo, es posible que este género se haya incrementado en la dieta MZ ya que, no sólo posee “maquinaria metabólica” para degradar la celulosa, sino que tiene genes para actividad amilolítica, los cuales se activan en presencia del sustrato, proveniente del grano de maíz.

Fibrobacter.

En el caso puntual de *Fibrobacter*, la RA resultó de 0,41% y 0,39% para CS y MZ, respectivamente. Estas leves diferencias entre dietas no resultaron significativas ($P > 0,05$), por lo cual no podemos asegurar mayor actividad celulítica en la dieta suplementada con cascarilla de soja, dado que los dos géneros más asociados a la degradación de este polímero, *Ruminococcus* y *Fibrobacter*, no aumentaron en este tratamiento.

Menezes et al. (2011) comparó la composición del microbioma entre las dos fases de rumen, sólida vs. líquida, para dieta TMR y pastura. Como resultados distintivos, no sólo encontraron mayor diversidad en la fase líquida y en la dieta TMR, sino que además reportaron que el género *Fibrobacter* se ve incrementado en la dieta TMR, atribuyendo este resultado a la presencia de paja de cereal (30% de la MS de la TMR). En adición, Jami et al. (2014) también en vacas lecheras bajo una dieta 30:70 F:C, indica que *Fibrobacter* estuvo ausente en la mayoría de los animales y que no suele detectarse en dietas con baja proporción de fibra. Ambos trabajos sugieren dos puntos importantes en la relación *Fibrobacter*-degradación de la fibra: por un lado, el contenido total de fibra de la dieta y, por otro, el tipo de fibra en cuanto a su composición. En este sentido, la mayor

asociación con un forraje como la paja de cereal daría cuenta de mayor potencial para actuar sobre lignocelulosa o como lo indican Brulc et al. (2008), sobre “estructuras más recalcitrantes”. Estos autores realizaron un estudio de metagenómica de los microorganismos ruminales adherentes a la fibra, detectando un gran número de glicosil-hidrolasas (22 en total) digitadas básicamente por la dieta. De ese estudio puede deducirse que existen dos tipos de organismos y sets de genes: los de la primera colonización, que atacan las cadenas laterales de los carbohidratos más disponibles de la pared celular y luego, los que atacan los materiales menos degradables como la celulosa.

Con mayor grado de detalle, Koike et al. (2003; 2004) estudiaron la colonización de la fibra por parte de las principales especies fibrolíticas del rumen, *Fibrobacter succinógenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *albus*, y encuentran que el sustrato influencia las proporciones de las distintas cadenas o grupos dentro de la especie. Así es como para *F. succinógenes* se reportan cuatro grupos filogenéticos, de acuerdo a la secuencia del 16SrDNA, siendo el grupo 1 menos activo en la degradación de celulosa y más asociado a forrajes frescos y el grupo 3 más abundante en dietas a base de heno (Koike et al., 2004). En base a la información citada, es posible que la composición química o estructura de la fibra de las dietas estudiadas en el presente trabajo de tesis sea la que explique las bajas RA de este género.

Butyrivibrio.

A través de la secuenciación de la subunidad 16SrDNA se ha comprobado una gran diversidad genética en este género (Forsberg et al., 1997; Willems et al., 1996; Kopečný et al., 2001). Varias secuencias de *Butyrivibrio* participan en la degradación de la fibra, pudiendo sintetizar celodextrinasas y xylanasa (estas últimas muy variables entre especies), aunque son pocas las que poseen β -1,4 endoglucanasa la cual permite romper los enlaces β -1,4 de la celulosa (Stewart et al., 1997). Kopečný et al. (2003) aislaron las secuencias de lo que, posteriormente, nombraron como *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* y *Butyrivibrio hungatei*, tanto en vaca como en oveja, y confirmaron la presencia de xylanasa, proteasa, pectin-hidrolasas y β -1,4 endoglucanasas para la primera pero la ausencia de actividad fibrolítica para la segunda. Además de su actividad sobre la degradación de la fibra, Attwood y Reilly (1995) indicaron que este género tiene un rol fundamental en la degradación de proteínas a nivel ruminal así como también se ha demostrado que algunas secuencias tienen actividad amilolítica (McAllister et al., 1990).

En el caso de *Clostridium proteoclasticus* o *Butyrivibrio proteoclasticus*, luego de su reclasificación (Moon et al., 2008), se ha demostrado que posee actividad degradativa sobre proteínas y polisacáridos como xylanos, pectinas y almidón, no obstante no puede romper la estructura de la celulosa cristalina (Attwood et al., 1996; Kelly et al., 2010) y, además, se lo ha relacionado con la biohidrogenación de los ácidos grasos en la producción de ac. esteárico (C18:0) a partir de vaccénico por la vía del ac. linoleico (Wallace et al., 2006; Moon et al., 2008). En este sentido, Jeynathan et al. (2016) señalan que *Butyrivibrio fibrisolvens* representa la especie de mayor importancia en este proceso, aún sin haber demostrado capacidad para formar esteárico desde que fue identificada por primera vez con la BH (Polan et al., 1964) pero sí para la isomerización del ac. linoleico a CLA (Kepler et al., 1966).

Este género resulta de gran importancia en el presente trabajo de tesis ya que es uno de los grupos bacterianos más vinculados al proceso de BH junto con *Pseudobutyrvibrio* (Wallace et al., 2006). Sin embargo, cabe preguntarse si aún en la era

de la genómica se pueden descifrar todas las bacterias del “Grupo A y B”, así llamadas por Kemp y Lander (1984) y luego tomadas por Bauman (1999), para describir su participación en los diversos pasos de la BH.

4.4. Biohidrogenación y microbioma bacteriano: pasos metabólicos y géneros del “A and B groups”.

Si se utiliza como “molde” el esquema de la BH descrito originalmente por Bauman (1999) para relacionar los AG generados con la dieta, se podrían diferenciar las dos rutas metabólicas: la de los *trans-11* en MZ (Fig. 10) y los *trans-10* en CS (Fig. 11).

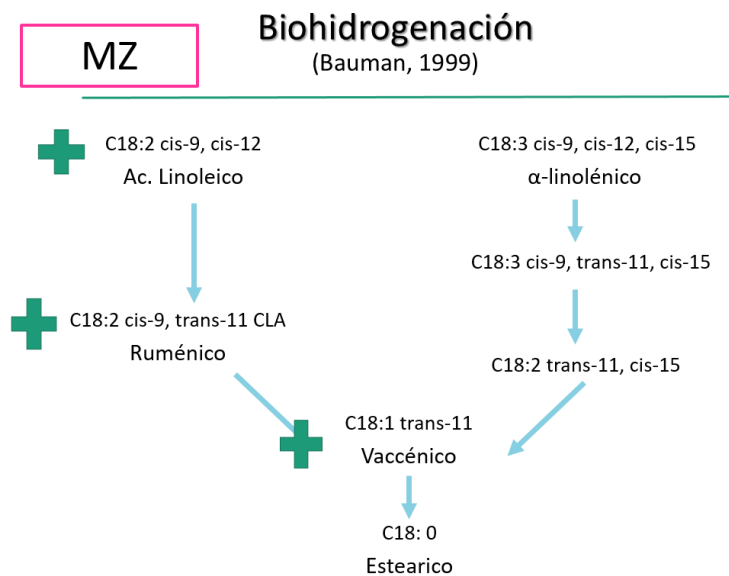


Figura 10. Esquema del proceso de BH del ácido linoleico y linolénico para la dieta MZ indicando los AG e intermediarios que resultarían superiores (adaptado de Bauman, 1999).

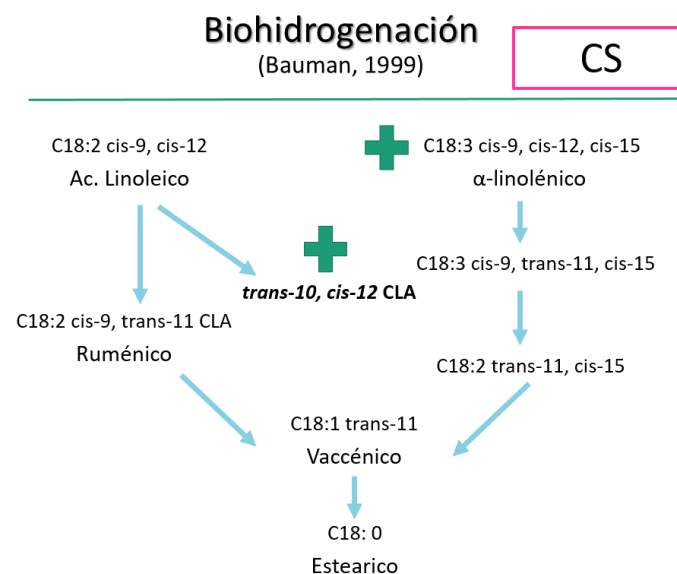


Figura 11. Esquema del proceso de BH del ácido linoleico y linolénico para la dieta CS, indicando los AG e intermediarios que resultaron superiores (adaptado de Bauman, 1999).

Para ese entonces, Bauman indicó que las bacterias actuantes en los distintos pasos del proceso pertenecían a los grupos A o B o ambos de acuerdo con Kemp y Lander (1984), sin hacer una descripción filogenética (Figura 12).

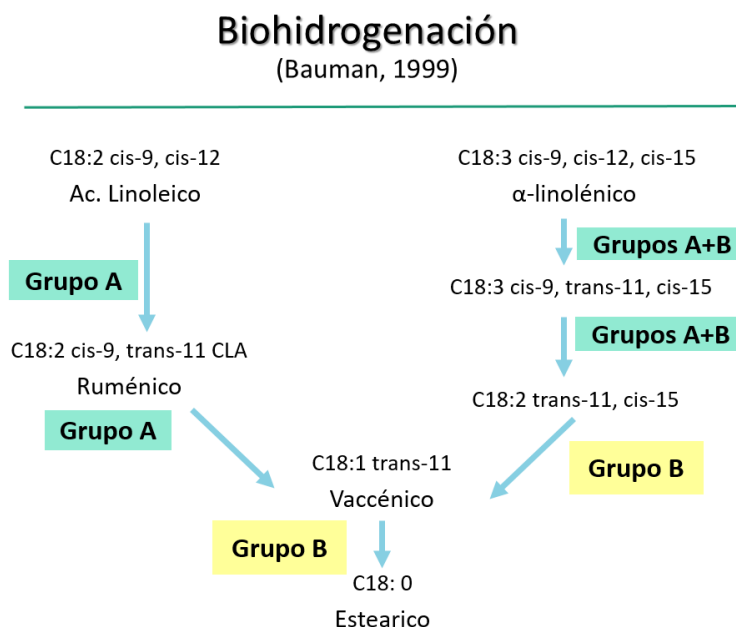


Figura 12. Esquema del proceso de BH del ácido linoleico y linolénico integrando los grupos bacterianos asociados a los distintos pasos metabólicos (adaptado de Bauman, 1999).

Años más tarde, se sabía que el principal actor del grupo A era *Butyrivibrio fibrisolvens* en la conversión de linoleico a ruménico y de ruménico a vaccénico por un lado y, por el otro, que *B. proteoclasticus* saturaba el vaccénico hasta esteárico (Vasta et al., 2010) e inclusive algunos trabajos con ovejas lecheras han reportado cambios en los pasos metabólicos de la BH relacionados con otros grupos bacterianos pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae* y *Quinella* (Torral et al., 2012).

A fin de dilucidar las posibles relaciones entre la BH y los grupos bacterianos en cada dieta, se realizó un análisis de componentes principales construido a partir de las concentraciones de los principales AG vinculados al proceso de BH y las RA de las asignaciones taxonómicas que difirieron entre tratamientos. En la Figura 14 se pueden apreciar dos grupos bien definidos de taxones separados por la componente 1, no obstante la distribución de los AG es más dispersa.

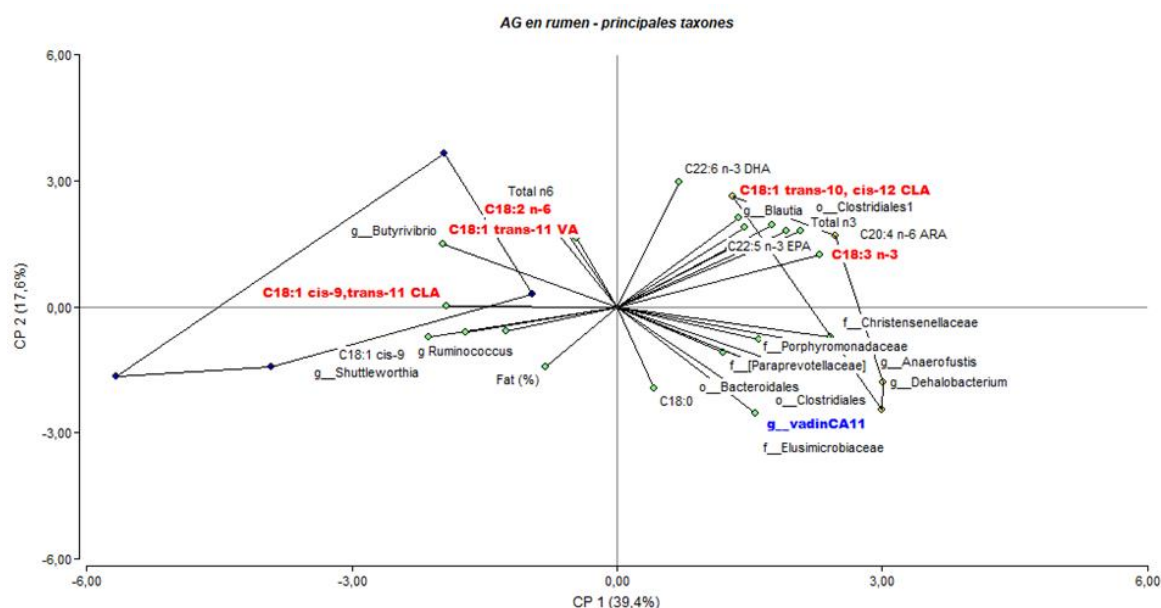


Figura 13. Análisis de componentes principales entre los AG de cadena larga y las asignaciones taxonómicas identificadas a nivel de orden, familia y género que difirieron entre dietas ($P < 0.05$). En rojo se marcan los AG vinculados a los pasos metabólicos del proceso de BH.

El género *Butyrivibrio* se encuentra muy cercano al *cis-9, trans-11* CLA y *trans-11* (Figura 13) en concordancia con las mayores concentraciones de estos isómeros en la dieta MZ que fueron reportados en el capítulo anterior (Cuadro 13), la cual posee mayor RA de *Butyrivibrio* respecto de CS (aprox. 10 vs. 5%; Figura 9). El posterior análisis de correlación permitió confirmar dicha asociación al obtener una correlación altamente significativa entre la RA de *Butyrivibrio* y la concentración de *cis-9, trans-11* CLA ($P < 0,01$; $r=0,79$). Esta coincidencia del grupo bacteriano con el paso metabólico de la BH de los *trans-11*, sumado al mayor consumo de linoleico como precursor, podrían explicar la acumulación de estos isómeros en el escenario de una dieta alta en grano de maíz (almidón) y con menor pH ruminal, contrario a lo que ha sido reportado en vacas. Dado que el análisis de metagenómica permitió llegar hasta el nivel de género, no hay certeza de qué especie de *Butyrivibrio* se trata, si efectivamente es *B. fibrisolvens* o alguna otra especie que tolere el bajo pH y esté más vinculado a la degradación del almidón.

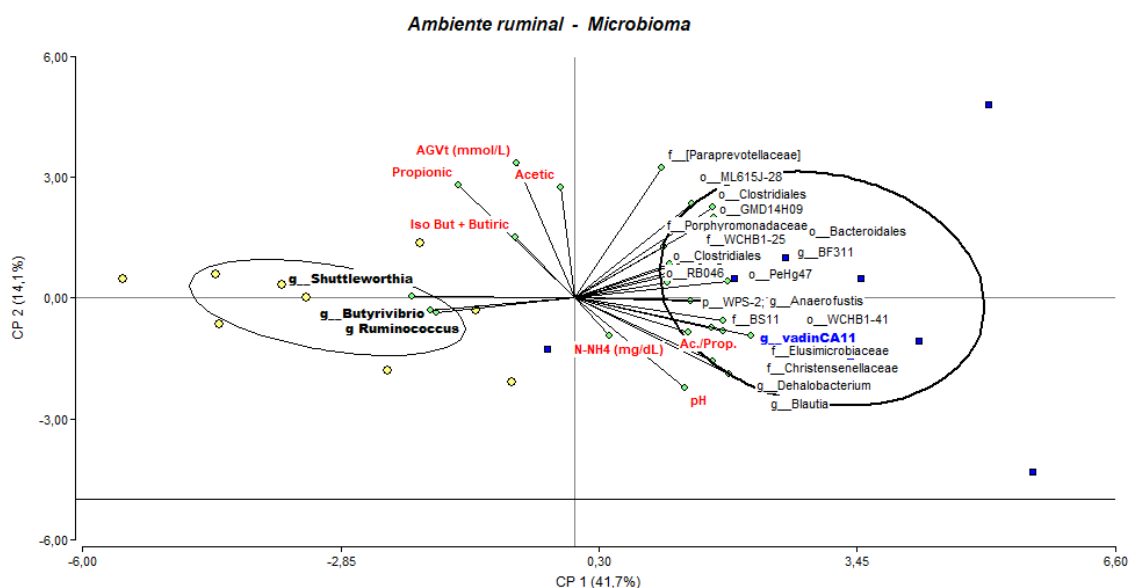


Figura 14. Análisis de componentes principales entre los parámetros de ambiente ruminal y las 23 asignaciones taxonómicas que difirieron entre dietas ($P < 0.05$). En rojo se marcan los parámetros que caracterizan al ambiente ruminal.

Estudios de microbiología clásica por medio de técnicas de cultivo y utilización de sustratos han demostrado que algunas cadenas de *Butyrvibrio* producen ácido propiónico por la vía del acrilato (Lee y Moore 1959), así como algunos *Ruminococcus* producen ácido propiónico a través de la vía del succinato en ausencia de metanógenos (Latham y Wolin, 1977). Si observamos la relación entre las RA de los principales taxones y los parámetros de ambiente ruminal en un análisis de componentes principales (Figura 14), a priori parecería no haber asociación entre el ácido propiónico y el género *Butyrvibrio*. Sin embargo, al analizar la relación Ac./Prop. como variable regresora sobre la RA de este género, se obtiene una regresión negativa significativa ($P < 0.05$; $R^2 = -0.45$) como muestra la figura 15, lo que supondría superiores RA de *Butyrvibrio* con menores proporciones de acético o mayores proporciones de ac. propiónico.

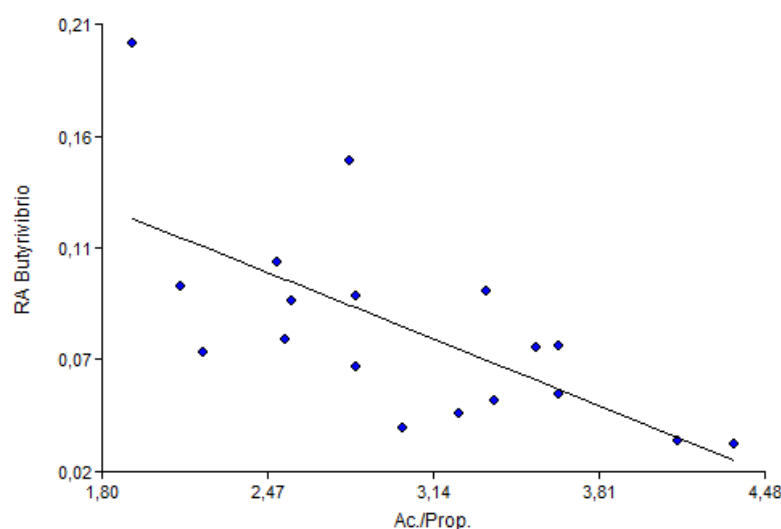


Figura 15. Correlación entre RA del género *Butyrvibrio* y la relación Acético/Propiónico para ambas dietas en conjunto.

Estos resultados coinciden con lo informado en el Cuadro 12 (capítulo 3), donde la relación Ac./Prop. fue significativamente mayor en la dieta CS (3,97 vs 2,58) la cual presenta, a su vez, menores RA de *Butyrivibrio*. Un género muy cercano a *Butyrivibrio*, de acuerdo con el análisis de componentes principales y también significativamente superior en la dieta MZ, es *Shuttleworthia*. Este género ha sido reportado por Jami y Mizrahi (2012) en vacas Holstein bajo una dieta con una relación forraje:concentrado de 30:70, no siendo considerado como parte de la comunidad núcleo o “core microbiome” dado que sólo apareció en algunos individuos del estudio. Poco se sabe aún de su actividad metabólica, no obstante trabajos recientes en vacas lecheras demuestran una posible relación con bajos consumos residuales, es decir, animales más eficientes (Jewell et al., 2015).

Por otro lado, Tapio et al. (2017) encontraron mayores RA de *Shuttleworthia* en dietas con alta proporción de concentrado, en coincidencia con la dieta suplementada con grano de maíz en nuestro trabajo. Al realizar una búsqueda en la base “Nucleotide” del NCBI de este género relacionado con el rumen sólo se hallaron 7 ítems que representan, en realidad, la misma secuencia con diferentes números de acceso (7) y se trata de una secuencia no cultivada de *Shuttleworthia* de aproximadamente 330 pares de bases aislada de rumen de corderos (Belenguer, 2018). Es importante mencionar esto ya que, si se buscan secuencias de especies dentro de los principales géneros como *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, entre otros, se encontrarían muchísimas más secuencias reportadas y podría obtenerse más información sobre su actividad fermentativa a través de la búsqueda de los genes que codifican para las diversas enzimas. En este caso, es claro que el género *Shuttleworthia* está poco estudiado y los resultados son aún incipientes. A partir de su cercanía con *Butyrivibrio* (figura 13) se analizaron algunas correlaciones y se encontró que ambos géneros están altamente correlacionados ($P < 0,01$; $r=0,80$). Del mismo modo que con *Butyrivibrio*, *Shuttleworthia* también presentó una correlación negativa con la relación Ac./Prop. ($P < 0,01$; $R^2 = -0,45$) por lo cual confirmaría su incremento en ambientes ruminales caracterizados por la mayor proporción de ácido propiónico.

Lo más distintivo parece ser la elevada correlación que muestra *Shuttleworthia* con la concentración de *cis-9, trans-11* CLA ($P < 0,01$; $r=0,81$), aún más alta que la del género *Butyrivibrio*. Estos resultados confirmarían, de acuerdo a lo esperado, la relación de *Butyrivibrio* con la vía de los *trans-11* en la BH y, por otro lado, una probable asociación del género *Shuttleworthia*, del cual poco se sabe sobre su metabolismo, con el proceso de BH y la acumulación del *cis-9, trans-11* CLA.

Tomando como base el esquema molde de la figura 11, en la dieta CS, podemos observar la acumulación del isómero *trans-10, cis-12* CLA, contrario a lo reportado en vacas ya que este isómero se convierte en un intermediario mayoritario de la BH en dietas con alto contenido de almidón o en dietas suplementadas con aceites vegetales o marinos (Bauman y Grinari, 2001; Shingfield y Grinari, 2007).

Si bien los estudios de microbioma asociados al proceso de BH han demostrado que *Butyrivibrio* es el grupo más importante, Mc Kain et al. (2010) indicaron que el metabolismo del ácido linoleico por parte de este género involucra la formación de ruménico y vaccénico pero no la formación de los isómeros *trans-10, cis-12* CLA y *trans-10*. De hecho, estos isómeros han sido asociados con el MFD y, de acuerdo con Lourenco et al. (2010), las bacterias vinculadas a este síndrome serían grupos diferentes a las involucradas en el proceso de BH. Del mismo modo que se analizaron las cercanías de *Butyrivibrio* y *Shuttleworthia* con el *cis-9, trans-11* CLA, en el escenario opuesto (dieta CS) muy cercano al *trans-10, cis-12* CLA se encontró al género *Blautia* (Figura 16).

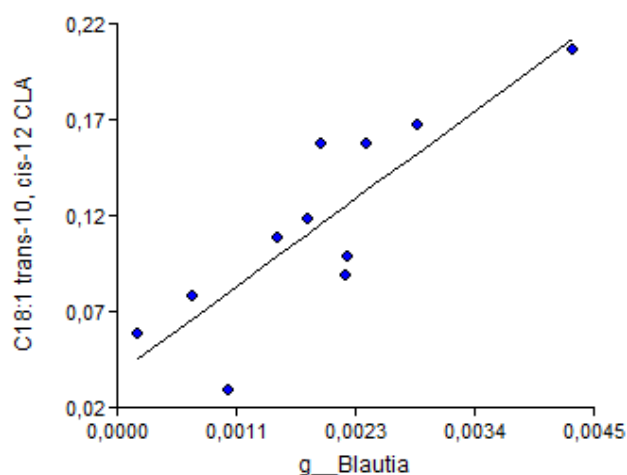


Figura 16. Correlación entre la concentración del isómero *trans-10, cis-12* CLA (g/100g FAMES) con la RA del género *Blautia* para ambas dietas en conjunto.

El análisis de correlación mostró una alta y positiva asociación ($P=0,0007$; $r=0,84$) ya que se obtuvo un mayor grado de asociación con respecto a los obtenidos con los géneros anteriores para el caso del *cis-9, trans-11* CLA. Del mismo modo que para el caso de *Shuttleworthia*, al realizar la búsqueda de secuencias de *Blautia* ligadas al rumen, el NCBI muestra 11 registros que representan secuencias parciales de la subunidad 16S (más de 1000 pares de bases) aisladas de ovinos (Henderson et al., 2009; 2010) y ganado bovino (Lyju et al., 2017) y secuencias no cultivadas (aprox. 330 pares de bases) provenientes de ovinos (Belenguer, 2018). Este hecho ilustra la poca información con la que se cuenta para intentar comprender la actividad metabólica en su totalidad al estudiar los genes-enzimas ligados a diversos procesos fermentativos en el rumen. Sin embargo, se sabe que dos especies como *B. Schinkii* y *B. producta*, presentes en rumen, están vinculadas a la síntesis de ácido acético y a la disminución en la producción de metano (Henderson et al., 2010).

Son escasas las referencias sobre este género en relación al proceso de BH, aunque un trabajo muy reciente en cabras muestra correlación positiva con la acumulación de esteárico pero no con la acumulación de los *trans-10*, señalando que los grupos bacterianos ligados a la formación de estos isómeros permanece, aún, sin develarse (Dewanckele et al., 2018).

Las correlaciones de los géneros *Shuttleworthia* con el *cis-9, trans-11* CLA y de *Blautia* con el *trans-10, cis-12* CLA del actual estudio representan una contribución para completar los eslabones faltantes que permitan identificar fehacientemente los géneros y especies mencionados como “A and B groups” del proceso de BH.

4.5. Conclusiones.

La dieta CS se caracterizó por una mayor diversidad microbiana y una abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes muy similar a la reportada para dietas de rumiantes en la base de datos “Ribosomal Data Base Project”. En MZ, la proporción de Firmicutes resultó superior a expensas de un menor contenido de Bacteroidetes.

A nivel género, se encontraron 90 asignaciones taxonómicas de las cuales 23 difirieron entre dietas y sólo 3 resultaron incrementados en la dieta MZ: *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* y *Shuttleworthia*. Estos dos últimos géneros se correlacionaron fuertemente entre sí y con el isómero *cis-9, trans-11* CLA. En el escenario opuesto, el isómero *trans-*

10, *cis*-12 CLA mostró una significativa correlación con el género *Blautia*, el cual resultó superior en la dieta CS.

Los perfiles de BH ruminal en la oveja podrían responder a la actividad de otros grupos bacterianos, no sólo *Butyrivibrio* como se reportó ampliamente en vacas, sino también géneros como *Shuttleworthia* y *Blautia*. Un dato importante es que los tres géneros pertenecen a la misma familia: Lachnospiraceae, y de este modo, estos resultados representarían un aporte al trabajo de Toral et al. (2012) quienes señalaron que algunas especies de esta familia estaban vinculadas al proceso de BH en ovejas lecheras.

CAPITULO 5.

Analizando el esquema completo: Dieta – Rumen - Leche.

Las ovejas suplementadas con cascarilla de soja presentaron mayor CMS explicado, posiblemente, por la alta degradabilidad de este suplemento (Vasta et al., 2008; Hein, 2009; Dann, 2010) y por el efecto de sustitución que genera el grano de maíz, el cual deprimió el consumo de forraje, de acuerdo con lo descrito por Dixon y Stockdale (1999). Esto es contrario a lo encontrado en algunos estudios con vacas lecheras para niveles de inclusión de cascarilla en reemplazo del maíz similares al actual estudio, donde el CMS tendió a disminuir, al igual que la PL (Ipharraguerre et al., 2002). Sin embargo, es importante considerar que estas respuestas en consumo y producción no dependen sólo del tipo y cantidad de suplemento sino del forraje base con el que se da una interacción a nivel ruminal.

Además, cabe considerar las diferencias entre especies ó clase de rumiante descriptas por Hofmann (1989), quien diferencia a los rumiantes mayores, en este caso el bovino, de los rumiantes intermedios, como la oveja, por la anatomía y fisiología del rumen, las tasas de pasaje, capacidad de digestión de forrajes vs. granos, entre otras características. La fase de la lactancia es otro factor que incide sobre el eje “requerimientos-consumo de energía”, por lo que las variaciones en CMS como respuesta a la suplementación con cascarilla en lactancia temprana no son iguales a lactancia media (Gentil et al., 2011; Zambon et al., 2012).

El mayor CMS en CS se tradujo en mayor PL, respondiendo a lo indicado por Campling et al. (1969) de que el consumo es la variable de mayor incidencia sobre la performance animal, pese a que no se detectaron diferencias estadísticas por el bajo poder de la prueba. El “n” limitante y a la alta variabilidad entre individuos es uno de los puntos a considerar en este estudio, así como en la mayoría de los experimentos en producción animal. Sin embargo, fue notorio que las ovejas que consumieron cascarilla produjeron en promedio 310ml más de leche/d (+24%). Si trasladamos esta diferencia del 24% a una PL promedio de 0.8L/d y 220 días de lactancia, aproximadamente, en raza Pampinta, estaríamos obteniendo cerca de 42 litros más de leche y de 6 a 8Kg más de queso (semiduro y fresco, respectivamente) por oveja en ordeño (Bain et al., 2002).

El tipo de carbohidrato suplementado también produjo cambios en la calidad de la leche, resultado del tipo de fermentación a nivel ruminal y de los productos generados en el proceso de BH. En la dieta CS, el mayor aporte de fibra y, a su vez, un ambiente ruminal más óptimo para la degradación de la misma (valores superiores de pH) condujeron a una producción de ácido acético superior, lo que favoreció las vías del metabolismo lipogénico y produjo mayor contenido de grasa en leche (Baldwin et al., 1965; Ballard y Hanson, 1965; Orskov et al., 1969; Vernon et al., 1981; Xiong et al., 2002; Schmidt y Zsédely, 2011). Resulta llamativo que en este tipo de ambiente ruminal, se encontraron diferencias en las vías de la BH que, ciertamente, resultaron opuestas a lo planteado en las hipótesis del actual trabajo. En vacas lecheras, los isómeros *trans-10* suelen producirse en ambientes ruminales con bajo pH y dietas con mayor proporción de grano, similares a MZ (Loor et al., 2003; Chilliard et al 2007). De todos modos, el pH promedio en la dieta CS también resultó bajo, muy cercano a 6 (6,2 CS vs. 5,8 MZ). Presumiblemente, la producción de isómeros *trans-10* no sea resultado del sustrato en sí mismo, como el caso del almidón, sino consecuencia de la fermentabilidad del alimento. Por tal motivo, un carbohidrato fibroso de elevada degradabilidad como la cascarilla de soja, podría alterar los pasos normales de la BH en pos de mayor acumulación ruminal de isómeros *trans-10*. La suplementación con MZ tendió a mayores contenidos de ruménico (*cis-9*, *trans-*

11 C18:2) y una concentración significativamente mayor de ácido vaccénico (*trans-11* C18:1), en contraste con lo reportado en vacas (Grinari et al., 1998; Grinari y Bauman, 1999; Sauvant et al., 2000; Boeckert et al., 2008). Sin embargo, dado que el consumo de ácido linoleico fue significativamente superior en esta dieta, esta vía de acumulación está explicada por el mayor consumo de precursores. Pero, la tendencia a mayor concentración del isómero *trans-10, cis-12* C18:2 en CS no podría explicarse simplemente por el bajo pH.

Este resultado plantea el interrogante sobre cuáles son los mecanismos que efectivamente operan en la BH y si estos mecanismos son compartidos por todas las clases de rumiantes o pueden ser “huésped” dependiente. Queda claro que la suplementación energética plantea modificaciones en los patrones de BH y que los intermediarios generados en dicho proceso posiblemente dependan más de la composición del microbioma, cuya actividad no varía en forma proporcional a las variaciones de los parámetros de ambiente ruminal. Los grupos bacterianos más vinculados a este proceso son los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, aunque algunos trabajos con ovejas lecheras relacionan a la BH con grupos de bacterias de la familia *Lachnospiraceae* y *Quinella* (Boeckert et al., 2009; Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2010; Toral et al., 2012). El perfil de abundancias relativas de la dieta CS resultó muy similar al reportado en el Ribosomal Data Base Project para un gran número de muestras. No obstante, en el caso de MZ la proporción de Firmicutes resultó superior a expensas de un menor contenido de Bacteroidetes, los cuales están representados, fundamentalmente, por el género *Prevotella*. A diferencia de varios estudios en bovinos, donde *Prevotella* suele ser el género más abundante (RA 40%, aprox.) (Jami et al., 2012; Meiju Lee et al., 2012; Menezes et al., 2015; McCabe, 2015, comunicación personal) en el actual estudio resultó en bajas RA (16,13% CS y 12,39% MZ).

Dos de los principales géneros bacterianos del rumen, históricamente relacionados con la digestión de la fibra, como *Ruminococcus* y *Butyrivibrio*, se vieron incrementados en la dieta MZ, lo cual a priori parecería incoherente. Sin embargo, aún con extensa bibliografía que reporta fuerte actividad fibrolítica de ambos géneros sobre diversos sustratos dentro de la estructura de la fibra, como ser componentes de la hemicelulosa (xylanos, arabinosa, etc.), pectinas, celulosa amorfa o cristalina, etc., se ha reportado también la presencia de actividad amilolítica (Weigmann et al., 2014; Ze et al., 2015; La Reu et al., 2017). El conocimiento fue evolucionando desde las reacciones “enzima-sustrato” en cultivos en cápsula de Petri hasta en estudios de secuenciación de DNA donde es posible ver la presencia de genes que codifican para la degradación del polímero de almidón. Esto permitió, con ayuda de técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas, saber que existen especies dentro de estos grupos que tienen actividad amilolítica aun siendo clasificadas como “celulolíticas” como el caso de *Ruminococcus*. Por otro lado, saber que existen especies dentro del grupo clasificado como “celulolítico” que no degradan celulosa específicamente sino que atacan hemicelulosa y pectinas, como ocurre con algunos butyrvibrios (Attwood et al., 1996; Kelly et al., 2010). Más aún, buscando las secuencias de ciertas especies de butyrvibrios en la base “Nucleotide” del NCBI podríamos comprobar la presencia de genes que codifican para degradar almidón y la ausencia de genes específicos para degradar celulosa.

Bajo estas evidencias, la clasificación de bacterias del rumen del modo que tradicionalmente se ha estudiado y enseñado con el concepto de “celulolíticas” y “amilolíticas” podría ponerse a prueba a la luz de los conocimientos actuales. De modo que la dieta MZ, posiblemente, presentó mayores RA de *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* ya que predispuso a la proliferación de aquellas especies con fuerte actividad amilolítica o, tal vez, permitió que trabajen en conjunto ambos grupos dentro del mismo género: las que

degradan fibra, cuyo sustrato sería el raigrás y son las que suelen estar siempre y, además, las que degradan almidón. O simplemente sea que el rumen es un ambiente tan dinámico que encuentra la forma de activar “maquinarias metabólicas” para todo tipo de sustrato, independientemente de quien la ejecute, es decir, que la ecología del rumen está preparada para priorizar las funciones por sobre la bacteria (Jami et al., 2012). Más allá de las variaciones en la estructura de la comunidad dadas por los cambios en abundancias relativas observadas en este trabajo, son las funciones que desempeña el microbioma en su conjunto lo que más define la funcionalidad de una dieta. Es por esto que a la era de la genómica y la actual “post-genómica”, con altas cargas de bases de datos e información para analizar, se suma el área de la transcriptómica ruminal, basada en el estudio global de los genes del rumen, independientemente de quien los ejecute.

Se corroboró que el género *Butyrivibrio* está fuertemente ligado al isómero *cis-9, trans-11* CLA o ac. ruménico, siendo de especial interés su alta asociación con el género *Shuttleworthia*, también incrementado en la dieta MZ y muy asociado al *cis-9, trans-11* CLA. En el escenario opuesto, el isómero *trans-10, cis-12* CLA mostró una significativa correlación con el género *Blautia*, el cual resultó superior en la dieta CS. Esto demuestra que es posible encontrar otros grupos de bacterias ligadas al proceso de BH y completar los “A and B groups” mencionados por Bauman (1999) sin indicar específicamente el microorganismo. La importancia relativa que tienen en este estudio *Shuttleworthia* y *Blautia* por sus fuertes asociaciones con los isómeros CLA, sumado a que las secuencias de la base de NCBI indican que se aislaron de ovinos, como las de Belenguer et al. (2018), ponen en foco de discusión que los patrones “normales” de la BH en vacas no serían estrictamente traspolables a la oveja. De acuerdo con Toral et al. (2012), algunas especies de la familia Lachnospiraceae estaban vinculadas al proceso de BH en ovejas lecheras, sin haber especificado qué géneros. Los resultados del actual estudio permiten avanzar sobre este aspecto, ya que los tres géneros correlacionados con los isómeros CLA pertenecen a dicha familia. Sería interesante, en un trabajo posterior, investigar la presencia de enzimas que tienen en común estos tres géneros, involucradas en la lipólisis, desaturaciones, isomerizaciones y todas las reacciones posibles dentro del proceso de BH.

Pese a los perfiles observados en rumen para los dos CLA con mayor impacto nutricional, no se encontraron diferencias tanto para el *cis-9, trans-11* C18:2 o el *trans-10, cis-12* C18:2 CLA en la grasa de la leche. Sin embargo, la suplementación con cascarilla produjo una leche superior en términos de calidad nutracéutica a través de una mayor concentración de PUFA y omega 3 y una mejor relación omega 6/omega 3. Esto no implica comprometerse con “la revolución de los nutraceúticos” de DeFelice (1995) ó asegurar que la leche proveniente de dietas suplementadas con cascarilla de soja consituye en sí misma un “alimento funcional” (Finley, 2016), sino tener presente que la nutrición de rumiantes es una herramienta para mejorar los productos destinados a la alimentación en humanos.

Queda mucho por avanzar en esta línea de investigación que, claramente, muestra que se requiere completar el esquema de la BH y dilucidar el origen de las bacterias que constituyen los “A and B groups”. No sólo para conocer su función, sino para saber si es posible, a través de la dieta, manipular las poblaciones microbianas en pos de obtener mayores niveles de intermediarios con funciones nutracéuticas como el *cis-9, trans-11* CLA. Será esa, la gran deuda de la metagenómica en un futuro cercano: potenciar los conocimientos sobre el eje “microbioma – genes/enzimas – metabolitos con beneficios sobre nutrición humana”.

Bibliografía.

1. Addis, M., Cabiddu, A., Pinna, G., Decandia, M., Piredda, G., Pirisi, A. y Molle, G. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in Sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. *J. Dairy Sci.* 88:3443-3454.
2. Akins, M., L. Ferraretto, S. Fredin, P. Hoffman y R. Shaver. 2012a. Balancing carbohydrate sources for dairy cows during a period of high corn prices. In: *Proc. Four-State Dairy Nutr. & Mgmt Conf.* Dubuque, IA. Pp. 18-23.

3. Akins, M.S., K.L. Perfield, H.B. Green y R.D. Shaver. 2012b. Effects of Rumensin in lactating cow diets with differing starch levels. In: Proc. High Plains Dairy Conf. Amarillo, TX.
4. Alifakiotis T. A., Katanos I., Hatjiminaoglou I., Zervas N. y Zerfiridis G. 1980. Induced lactation in dairy ewes by various brief hormone treatments. J. Dairy Sci. 63(5):750-5.
5. Alves, S. P., Cabrita, A. R. J., Jerónimo, E., Bessa, R. J. B. y Fonseca, A. J. M. 2011. Effect of ensiling and silage additives on fatty acid composition of ryegrass and corn experimental silages. J. Anim. Sci. 2011, 89:2537-2545.
6. Allen, M.S. 2012. Adjusting concentration and ruminal digestibility of starch through lactation. In: Proc. Four-State Dairy Nutr. & Mgmt Conf. Dubuque, IA. Pp. 24-30.
7. Arab, A., Aldin, S., Akbarian, Ghiyasvand, R. y Miraghajani, M. 2016. The effects of conjugated linoleic acids on breast cancer: A systematic review. Adv. Biomed. Res. 2016; 5: 115.
8. Attwood, G.T., Reilly, K. y Patel, B.K.C.1996. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:753–758.
9. Attwood, G. T. y Reilly, K. 1995. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. J. Appl. Bacteriol., 79: 22–29.
10. Awad, A. B. y Bradford, P. G. 2005. Nutrition and Cancer Prevention. CRC Press, 2005.
11. Bain, I., Salgado, E., Iglesias, R., Iñón, P., Marguet, E. R. 2002. Características de la producción de leche de ovejas Frisonas, Texel y su cruce en el Valle Inferior del Río Chubut. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 22 (1): 351-352.
12. Baggot y Dennis. 1995.
<http://library.med.utah.edu/NetBiochem/FattyAcids/index.html>.
13. Baldwin R.L. 1965. Pathways of carbohydrate metabolism in the rumen. In: Physiology of digestion in the ruminant. Daugherty, R.W., Allen, R.S., Burroughs, W., Jacobson, N.L., McGilliard, A.D., editors. Washington, DC: Butterworth; 1965. p. 379–89.
14. Ballard, F.J. y Hanson, R. W. 1967. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. Biochem. J., 105:529-36.
15. Bargo, F., Delahoy, J. E., Schroeder, G. F., Baumgard, L. H. y Muller, L. D. 2006. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. Anim. Feed Sci. Technol. 131: 226–240.
16. Bauman, D.E. y Currie, W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci. 63:1514-1529.
17. Bauman, D. E., Baumgard, L. H, Corl, B. A. y Grinari, J. M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proc. American Soc. Anim. Sci.
18. Bauman, D. y Grinari, M., 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. Livestock Prod. Sci. Vol. 70: 15- 29.
19. Bauman, D. E., Harvatine, K. J. y Lock, A. L. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. Annu. Rev. Nutr. 31:299–319.
20. Baumgard, L. H., Corl, B. A., Dwyer, D. A., Sæbø, A. y Bauman, D. E. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer which inhibits milk fat synthesis. Am. J. Physiol. 278:R179–R184.

21. Bauchart, D., Ve´rite´, R. y Re´mond, B. 1984. Long-chain fatty acid digestion in lactating cows fed freCS grass from spring to autumn. *Can. J. Anim. Sci.* 64 (Suppl.), 330–331.
22. Bauchart, D., Durand, D., Mouty, D., Dozias, D., Ortigues-Marty, I. y Micol, D. 2001. Concentration and fatty acid composition of lipids in muscles and liver of fattening steers fed a fresh grass based diet. *Renc. Rech. Ruminants* 8:108.
23. Beauchemin, K., McGinn, S., Benchaar, C. y Holtshausen, L. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.*, 92: 2118–2127.
24. Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 1995. 73:2804–2819.
25. Belenguer, A. 2018. Uncultured *Blautia* sp. partial 16S rRNA gene, isolate Igm-Sheep. Direct Submission. 11-JAN-2018. Accession LT975497.1
26. Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P. y Hervás, G. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 93:3275–3286.
27. Bernard y Mc Neill, 1991. Effect of High Fiber Energy Supplements on Nutrient Digestibility and Milk Production of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 74(3):991–5J.
28. Bernard, J. K., 1990. Effect of row or roasted whole soybeans on digestibility of dietary nutrients and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:3231.
29. Bernard, J. K., H. E. Amos, M A. Froetschel, J. y Evans, J. 1988. Influence of supplement energy and protein synthesis and crude protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.* 71:2658.
30. Bernard L., Toral, P.G. y Chilliard Y., 2017. Comparison of mammary lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J Dairy Sci.* 100 (11):9338–9351.
31. Bichi, E., Hervás, G., Toral, P., Llor, J. J. y Frutos, P., 2013. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96:524–532.
32. Blasco I., Joy M., Ripoll G., Sanz A., Álvarez-Rodríguez J., Estopañán G. y Ripoll-Bosch, R. 2011. How Forage form can affect the fatty acid composition of animal products in the autumn -lambling flock. In : Bernués A. (ed.), Boutonnet J.P. (ed.), Casasús I. (ed.), Chentouf M. (ed.), Gabiña D. (ed.), Joy M. (ed.), López-Francos A. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.), Pacheco F. (ed.). *Economic, social and environmental sustainability in Sheep and goat production systems*. Zaragoza: CIHEAM / FAO / CITADGA, 2011. p. 293–298.
33. Blasi, D., Drouillard, J., Titgemeyer, E., Paisley, S. y Brouk, M. 2000. Soybean Hulls, Composition and Feeding Value for Beef and Dairy Cattle. Contribution No. 00-79-E from Kansas Agricultural Experiment Station, Kansas State University.
34. Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W. y Fievez, V. 2008. Effect of Dietary Starch or Micro Algae Supplementation on Rumen Fermentation and Milk Fatty Acid Composition of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:4714–4727.
35. Bocquier, F. y Caja, G. 1993. Recent advances on nutrition and feeding of dairy CSeep. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*, Budapest, 14–20 May. *Hungarian J. Anim. Prod.* 1(Supp.): 580–607.

36. Bocquier F. y Caja G. 2000. Effects of nutrition on the composition of CSeep's milk. In: Ledin I. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.). CSeep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands. Zaragoza: CIHEAM p. 59-74.
37. Boddugari, K., R.J. Grant, R. Stock y M. Lewis. 2001. Maximal replacement of forage and concentrate with a new wet corn milling product for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:873-884.
38. Boufaïed, H., Chouinard, P. Y., Tremblay, G. F., Petit, H. V., Michaud, R. y Bélanger, G. 2003. Fatty acids in forages. I. factors affecting concentrations. *Can. J. Anim. Sci* 83: 501–511.
39. Bremer, J. y Breitnke, G. 1983. A simple method for fermentation of ammonium in semi-micro kjeldhal analysed of soil and plant material using a block digester. *Soil. Sci. Plant Anal.* 14: 905- 913.
40. Broderick, G.A., D.R. Mertens y R. Simons. 2002. Efficacy of carbohydrate sources for milk production by cows fed diets based on alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 85:1767-1776.
41. Brown, W., AbuGhazaleh, A. A. y Ibrahim, S. A., 2008. Milk Conjugated Linoleic Acid Response to FiCS Oil and Linseed Oil Supplementation of Grazing Dairy Cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21(5): 663 – 670.
42. Brulc, J. M., Antonopoulos, D., Berg. M. E., Miller, M. K., Wilson, Yannarella, A. C., Dinsdale, E., Edwards, R., Frank, E., Emerson, J., Wacklin, P., Coutinho, P. M., Henricsson, B., Nelson, K. y White, B. 2008. *PNAS*, 106 (6) 1948–1953.
43. Buccioni, A., Antongiovanni, M., Minieri, S. y Rapaccini, S. 2009. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil Supplementation on in vitro fatty acid profile of Sheep rumen liquor. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (Suppl. 2), 274-276.
44. Buermans, H. y Den Dunnen, J. 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1932–1941.
45. Buseti, M.R. 2004. Composición de la leche de ovejas Pampinta a lo largo de un período de lactación. *Bol. Divulgación Técnica (INTA-Anguil)*, 71, p. 14. En: <http://www.inta.gov.ar/anguil/info/boletines/bol90/pdf/cap26.pdf>
46. Cannas, A. Pes, A.; Mancuso, R.; Vodret, B. y Nudda, A. 1998. Effect of dietary energy and protein concentration on the concentration of milk urea nitrogen in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 81:499-508.
47. Cannas, A., Van Soest, P. J. y Pell, A. N. 2003. Use of animal and dietary information to predict rumen turnover. *Animal Feed Science and Technology* 106:95-117.
48. Cannas, A., Cabiddu, A., Bomboi, G., Ligios, S., Floris, B. y Molle, G. 2013. Decreasing dietary NFC concentration during mid-lactation of dairy ewes: Does it result in higher milk production? *Small Rum. Res.* 111:41-49.
49. Caporaso, G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N. y Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*, 108 (suppl. 1), 4516-4522.
50. Castillo, V., Such, X., Caja, G., Casals, R., Salama, A.K. y Albanell, E. 2009. Long- and short-term effects of omitting two-weekend milkings on the lactational performance and mammary tight junction permeability of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 92, 3684-3695.
51. Chao, A. y Lee, S.M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *J. Am. Stat. Assoc.*, 87, 210–217.

52. Chaucheyras-Durand, F. y Faisury Ossa, F., 2014. REVIEW: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *Professional Anim. Scie.* 30:1–12.
53. Chaucheyras-Durand, F., E. Chevaux, C. Martin y E. Forano. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: *Probiotic in Animals*. E. C. Rigobelo, ed. InTech, Rijeka, Croatia. p. 119–162
54. Chen, J., Stevenson, D. M. y Weimer, P. J. 2004. Albusin B, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3167–3170.
55. Chilliard, Y., Ferlay, A. y Doreau, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, specially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Prod. Scie.* 70: 31–48.
56. Chilliard, Y. y Ferlay, A., 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:467–492 467.
57. Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. y Lamberet. G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770.
58. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J. y Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855.
59. Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J. y Doreau, M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211.
60. Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J. y Doreau, M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211.
61. Christopherson, M. R., Dawson, J. A., Stevenson, D. M., Cunningham, A. C., Bramhacharya, S., Weimer, P. J., Kendziorowski, C. y Suen, G. 2014. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal methanogen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 15:1066.
62. Church, D. C. 1993. *El Rumiente: Fisiología Digestiva y Nutrición*. Primera edición. Editorial ACRIBIA, Zaragoza.
63. Coomer J.C., Amos, H. E. y Williams, C. C. 1993. Response of early lactation cows to fat supplementation in diets with different nonstructural carbohydrate concentrations. *J. Dairy Sci.* 76 (12), p.3747-3754.
64. Cowan, R. T., Robinson, J. J., McDonald, I. y Smart, R. 1980. Effects of body fatness at lambing and diet in lactation on body tissue loss, feed intake and milk yield of ewes in early lactation. *J. Agr. Sci.* 95, Issue 3, pp. 497-514
65. Dann, H.M., K.W. Cotanch, P.D. Krawczel, C.S. Mooney, R.J. Grant y T. Eguchi. 2008. Evaluation of low starch diets for lactating Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91 (E-Suppl. 1):530.
66. Dantas Lopes, L., Oliveira de Souza Lima, A., Gouve^a Taketani, R., Darias, P., Fe' da Silva, L., Manesco Romagnoli, E., Louvandini, H., Abdalla, A. y Mendes, R. 2015. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrateactive Enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek* 108:15–30.
67. Dassa, B., Borovok, I., Ruimy-Israeli, V., Lamed, R., Flint, H. J., Duncan, S. H., Henrissat, B., Coutinho, P. y Morrison, M. 2014. Rumen cellulosomics: divergent

- fiber-degrading strategies revealed by comparative genome-wide analysis of six ruminococcal strains. *PLoS One* 9, e99221.
68. DeFelice, S. L. 1995. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Sci. Tech.* Vol 6 (2): 59-61.
 69. Deng, W., D. Xi, H. Mao, y M. Wanapat. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: A review. *Mol. Biol. Rep.* 35: 265–274. Dunne, J. C., D. Li, W. J.
 70. DePeters, E. J. y Cant, J. P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.*, 75: 2043-2070.
 71. Dervishi, E., Joy, M., Sanz, A., Alvarez-Rodriguez, J., Molino, F. y Calvo, J. 2012. Forage preservation (grazing vs. hay) fed to ewes affects the fatty acid profile of milk and CPT1B gene expression in the sheep mammary gland. *BMC Vet. Res.*, 8:106.
 72. Dewanckele, L., Vlaeminck, B., Hernandez-Sanabria, E., Ruiz-González, A., Debruyne, M., Jeyanathan, J. y Fievez, V. 2018. Rumen Biohydrogenation and Microbial Community Changes Upon Early Life Supplementation of 22:6n-3 Enriched Microalgae to Goats. *Front. Microbiol.* 9:573.
 73. Dewhurst, R., Scollan, N., Lee, M., Ougham, H. y Humphreys, M. 2003. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 329- 336.
 74. Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D. y Pariza, M. W., 1999. Conjugated Linoleic Acid Content of Milk from Cows Fed Different Diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146–2156.
 75. Drackley, J. K. 2004. Overview of Fat Digestion and Metabolism in Dairy Cows. University of Illinois. Urbana, IL June, 2004.
 76. Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D. y Drancourt, M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1902–1907.
 77. Elgersma, A., Ellen, G. y Van der Horst, H., 2004b. Quick changes in milk fat composition from cows after transition from freCS grass to a silage diet. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 117 (1/2), 13-27.
 78. Elsik, C.G., Tellam, R. L. y Worley, K. C. 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Sci.*, 324: 522-528.
 79. Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis A. J. y Wallace, R. J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Anton Leeuw Int J G* 86: 263–281.
 80. Finley, J. W. 2016. The nutraceutical revolution: Emerging vision or broken dream? Understanding scientific and regulatory concerns. *Clinical Res. Regul. Affairs*, 33 (1): 1–3.
 81. Forsberg, C. W., K.-J. Cheng y B. A. White. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: *Gastrointestinal Microbiology* (Ed. R. I. Mackie y B. A. White). Chapman and Hall. New York. pp. 319-379.
 82. Franzolin R., St-Pierre B. y Northwood K. 2012. Analysis of rumen methanogen diversity in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) under three different diets. *Microb. Ecol.* 64(1):131–9.
 83. Gentil, R. S.; Susin, I.; Ferreira, E. M.; Cannas, A.; Eysink, D. y Leite, R. F. 2011. Influência da redução do amido e aumento da fibra digestível na produção e composição do leite de ovelhas. In: *Anais da 48a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*.

84. Gómez-Cortés, P., de la Fuente, M. A., Toral, P. G., Frutos, P., Juárez, M. y Hervás, G. 2011. Effects of different forage:concentrate ratios in dairy ewe diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.* 94:4578–4588.
85. Griinari, J. M., Dwyer, D. A., McGuire, M. A., Bauman, D. E., Palmquist, D. L. and Nurmela, K. V. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251–1261.
86. Griinari, J. M. y Bauman, D. E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.J. (Eds.). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1. Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign, IL, pp. 180–200.
87. Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.*, 73: 2820-2833.
88. Hamazaki, K., Itomura, M., Huan, H., Nishizawa, H., Watanabe, S., Hamazaki, T., Sawazaki, S., Terasawa, K., Nakajima, S., Terano, T., Hata, Y. y Fujishiro, S. 2003. n-3 long-chain FA decrease serum levels of TG and remnant-like particle-cholesterol in humans. *Lipids* 38:353–358.
89. Han X, Yang Y, Yan H, Wang X, Qu L, Chen Y. 2015. Rumen Bacterial Diversity of 80 to 110-Day-Old Goats Using 16S rRNA Sequencing. *PLoS ONE* 10(2): e0117811.
90. Harper, K. J. y McNeill, D. M. 2015. The Role iNDF in the Regulation of Feed Intake and the Importance of Its Assessment in Subtropical Ruminant Systems (the Role of iNDF in the Regulation of Forage Intake). *Agriculture* 5: 778-790.
91. Harvatine, K. J. 2012. Causes of Diet Induced Milk Fat Depression and Strategies To Recover. In: *Mid-South Ruminant Nutrition Conference - Grapevine, Texas*.
92. Hegarty, S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agr. Res.*, 50, pp. 1321-1327.
93. Hein, D. 2009. The Effect of Intake Level of a Soy Hull Diet on Digestibility in Ram Lambs and Mature Non-Lactating Ewes. Honors Thesis Presented to the College of Agriculture and Life Sciences, Department of Animal Sciences of Cornell University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Research Honors Program.
94. Henderson, G., Cox, F. Ganesh, S. Jonker, A., Young, W. Global Rumen Census Collaborators y Janssen, P. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5:14567.
95. Henderson, G., Naylor, G. E., Leahy, S. C. y Janssen, P. H. 2010. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (7), 2058-2066.
96. Highfill, B. D., D. L. Bo, H. E. Amos y J. G. Crickman. 1987. Effects of high fiber energy supplements on fermentation characteristics and in vivo and m situ digestibilities of low quality fescue hay. *J. Anim. Sci.* 65:224.
97. Hofmann, R. R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78:443M57.
98. Huisman, M. M. H., H.A. Schols y A.G.J. Voragen. 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. *Carbohydr. Polym.*, 37: 87–95.

99. Hungate, R. E., 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Can. J. Microbiol.*, 3: 289-311.
100. Hussein, M., K. H. Harvatine, W. M. P. B. Weerasinghe, L. A. Sinclair y D. E. Bauman. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J Dairy Sci.* 96(6):3825-34.
101. Iggo, A. y Leek, B. F. 1970. Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. A T Phillipson, Oriel Press Newcastle.
102. Ip, C., Banni S., Angioni E., Carta G., McGinley J., Thompson H.J., Barbano D. y Bauman D. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, 129 (12):2135–2142.
103. Ipharraguerre, I.R., R.R. Ipharraguerre y J.H. Clark. 2002. Performance of lactating dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J. Dairy Sci.* 85:2905-2912.
104. Jami, E. y Mizrahi, I. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE* 7(3): e33306. doi:10.1371/journal.pone.0033306.
105. Jami, E., White, B. y Mizrahi, I. 2014. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. *Plos ONE* 9(1): e85423.
106. Janssen, P. H. y Kirs, M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3619–3625.
107. Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J. y Mosley, E. E. 2008. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397–412.
108. Jewell, K.A., McCormick, C.A., Odt, C.L., Weimer, P.J. y Suen, G. 2015. Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:4697– 4710.
109. Jeyanathan, J., Escobar, M., Wallace, R. J., Fievez, V. y Vlaeminck, B. 2016. Biohydrogenation of 22:6n-3 by *Butyrivibrio proteoclasticus* P18. *BMC Microbiol.* 16:104.
110. Jiang, J., L. Bjoerck, R. Fonden y M. Emanuelson. 1996. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: Effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.* 79:438–445.
111. Jurjanz, S., Monteils, V., Juaneda, P. y Laurent, F., 2004. Variations of trans-octadecenoic acid in milk fat induced by feeding different starch-based diets to cows. *Lipids* 39, 19–24.
112. Kalač, P. y Samkova, E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 2010 (12): 521–537.
113. Kalscheur, K. F., Teter, B. B., Piperova, L. S. y Erdman, R. A. 1997a. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 2104–2114.
114. Kemnitz, D., Kolb, S. y Conrad, R. 2005. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environ. Microbiol.* 7:553–565.
115. Kemp, P. y Lander, J. 1984. Hydrogenation in vitro of α -Linolenic Acid to Stearic Acid by Mixed Cultures of Pure Strains of Rumen Bacteria. *J. Gen. Microbiology* 130: 527-533.

116. Kelly, W.J., Leahy, S.C., Altermann, E., Yeoman, C.J., Dunne, J.C., Kong, Z., Pacheco, D. M., Li, D., Noel, S. J., Moon, C. D., Cookson, A. L. y Attwood, G. T. 2010. The Glycobiome of the Rumen Bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus* B316T Highlights Adaptation to a Polysaccharide-Rich Environment. PLoS ONE 5(8).
117. Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J. y Tove, S. B. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 241, 1350–1354.
118. Kim, M., Morrison, M. y Yu, Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. FEMS Microbiol. Ecol. 76: 49–63.
119. Kim, E. U., Huws, S. A., Lee, M. R. F. y Scollan, N. D. 2009. Dietary transformation of lipid in the rumen microbial ecosystem. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 22: 1341–1350.
120. Klieve, A. V., D. Hennessy, D. Ouwerkerk, R. J. Forster, R. I. Mackie y G. T. Attwood. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. J. Appl. Microbiol. 95:621–630.
121. Klopfenstein, T. 1983. Byproducts for ruminants. In: Roc. Georgia Nu@. Cod. Feed Ind., Atlanta, GA. p. 120
122. Knudsen, K. E. B. 2014. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. Poultry Sci. 93:2380–2393.
123. Koike, S., J. Pan, T. Suzuki, T. Takano, C. OCSima, Y. KobayaCSi y K. Tanaka. 2004. Ruminal distribution of the cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* in relation to its phylogenetic grouping. Anim. Sci. J. 75:417–422.
124. Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi y K. Tanaka. 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. J. Dairy Sci. 86:1429–1435.
125. Kong, Y., Teather, R. and Forster, R. 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. FEMS Microbiol. Ecol. 74: 612–622.
126. Kopec'ny', J., Zorec, M., Mrá'zek, J., Kobayashi, Y. y Marins'ek-Logar, R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate producing bacteria from the rumen. Int. J. Systematic Evol. Microbiol. 53: 201–209.
127. Kramer, J. K. G, Parodi, P., Jensen, R., Mossoba, M., Yurawecz, M., Adlof, R., 1998. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. Lipids, 33 (8): 835–835.
128. Kucuk, O., Hess, B. W., Ludden, P. A. y Rule, D. C. 2001. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. J. Anim. Sci. 79:2233–2240.
129. La Reau, A. J., Meier-Kolthoff, J. P. y Suen, G. 2016. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. Microb. Genom. doi: 10.1099/mgen.0.000099
130. Lawson, R. E., Moss, A. R. y Givens, D. I. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. Nutr. Res. 14:153–172.
131. Lawson, P. A. y Finegold, S. M. 2015. Reclassification of *Ruminococcus obeum* as *Blautia obeum* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:789–793.
132. Li, M., Zhou, M., Adamowicz, E., Basarab, J. y Luo Guan, L. 2012. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S

- rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. *Veterinary Microbiology* 155:72–80.
133. Leiva, E., M.B. Hall y H.H. Van Horn. 2000. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 83:2866-2875.
 134. Lock, A. L. y Bauman, D. E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids.* 39:1197- 1206.
 135. Lock, A. L. y P. C. Garnsworthy. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livest. Sci.* 79:47–59.
 136. Loor, J. J., Bandara, A. B. y Herbein, J. H. 2002. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 86(11-12):422-32.
 137. Loor, J. J., Hoover, W. H., Miller-Webster, T. K., Herbein, J. H. y Polan, C. 2003. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids in continuous culture fermenters during digestion of orchardgrass or red clover with three levels of ground corn supplementation. *J. Anim. Sci.* 81:1611-1627.
 138. Loor, J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y. y Doreau, M. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of Trans Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 2472- 2485.
 139. Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A. y Chilliard, Y. 2005a. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J. Dairy Sci.* 88:726–740.
 140. Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A. y Chilliard, Y. 2005b. High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood and milk. *J. Dairy Sci.* 88:3986–3999.
 141. Lopes Zeola, M. B., Garcia da Silva Sobrinho, A., Tiemi Hatsumura, C., Borghi, T. H., Viegas, C. R. y Barbosa, C. 2015. Production, composition and processing of milk from ewes fed soybean seeds. *R. Bras. Zootec.* 44(4):146-154.
 142. Lourenco, M., Ramos-Morales, E. y Wallace, R. J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4 (7): 1008–1023.
 143. Lyju, J. V., Appoorthy, T., More, R. P. y Arun, A. S. 2017. Uncultured *Blautia* sp. clone OS100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Direct submission NCBI, accession MF360153.
 144. McAllister, T. A., Cheng, K. J., Rode, L. M. y Forsberg, C. W. 1990. Digestion of barley, maize and wheat by selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:46–53.
 145. McCabe, M., Cormican, P., Keogh, K., O'Connor, A., O'Hara, E., Palladino, R., Kenny, D. and Waters, S. 2015. Illumina MiSeq phylogenetic amplicon sequencing shows a large reduction of an uncharacterised *Succinivibrionaceae* and an increase of the *Methanobrevibacter gottschalkii* clade in feed restricted cattle. *Plos ONE*.
 146. McCann, J., Wickersham, T. y Loor, J. 2014. High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinform. Biol. Insights* 8:109–125.
 147. MacDonald, H. B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *J. Am. Coll Nutr.* 19:111S–118S.

148. MacGregor, C. A., P. G. Owen y L. D. McGl. 1976. Effect of increasing ration fiber with soybean mill run on digestibility and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 59:682.
149. McKain, N., Shingfield, K. J. y Wallace, R. J. 2010. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiol.* 156: 579–588.
150. Matar, A. M., Ayadi, M., Aljumaah, R. S., Nehdi, I. ., Sbihi, H. M., Souli, A. y Abouheif, M. A. 2017. Changes in the composition and fatty acid profile of Najdi ewes' milk before and after weaning. *South Afr. J. Anim. Sci.* 47 (3):320-326.
151. Meikle, A., Cavestany D., Carriquiry, M., Adrien, M de L., Artegoitia, V., Pereira, I., Ruprecht, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, J. M., de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., Astessiano, L., Olazábal, L., Mattiauda, D. y Chilbroste, P. 2013. Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*, 17 1:141-152.
152. Menezes, A., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B., Clipson, N. y Doyle, E. 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets *FEMS Microbiol. Ecol.* 78: 256–265.
153. Moate, P.J., Williams, S.R.O., Deighton, M.H., Jacobs, J.L. y Wales, W.J. 2013. Influence of rumen cannulation on feed intake, milk production, enteric methane production and composition of rumen headspace gas. *Adv. Anim. Biosci.* 4:423.
154. Moon, C. D., D. M. Pacheco, W. J. Kelly, S. C. Leahy, D. Li, J. Kopečný y G. T. Attwood. 2008. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate producing ruminal bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2041-2045.
155. Mould, F. L. y E. R. Ørskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
156. Nudda, A., Bencini, R.S., Mijatovic, S. y Pulina, G. 2002. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. *J. Dairy Sci.* 85: 2879-2884.
157. Nakamura, T. y F. G. Owen. 1989. High amounts of soyhulls for pelleted concentrate diets. *J. Dairy Sci.* 72:988.
158. NRC, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
159. NRC, 1985. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth Revised Edition. Committee on Animal Nutrition, National Research Council.
160. Paillard, D., McKain, N., Rincon, M.T., Shingfield, K.J., Givens, D.I. y Wallace, R.J. 2007. Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum* by real-time PCR using a molecular beacon approach. *J. Appl. Microbiol.* 103(4):1251–1261.
161. Palladino, R. A. 2014. Fatty acid intake and rumen fatty acid composition is affected by pre-grazing herbage mass and daily herbage allowance in Holstein dairy cows. *Span. J. Agric. Res.* 12 (3): 708-716.
162. Parodi, P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J Dairy Sci.*, Vol. 82:1339–1349.
163. Petri, R.M., R.J. Forster, W. Yang, J.J. McKinnon y T.A. McAllister, 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J. App. Microbiol.* 112 (6):1152–1162.

164. Petri, R., Schwaiger, T., Penner, G., Beauchemin, K., Forster, R., McKinnon, J., y McAllister, T. 2013. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. PLoS ONE 8(12): e83424.
165. Pitta, D. W., W. E. Pinchak, S. E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B. R. Min y J. Fulford. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. Microb. Ecol. 59:511–522.
166. Polan, C., J. McNeill y S. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. J. Bacteriol. 88:1056-1064.
167. Poulsen, M., Schwab, C., Jensen, B. B., Engberg, R. E., Spang, A. Canibe, N., Højberg, O., Milinovich, G., Fragner, L., Schleper, C., Weckwerth, W., Lund, P., Schramm, A. y Urich, T. 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. Nat. Commun. 4:1428.
168. Priego, A. y Sutherland, T. M., 1977. The effect of implantation of rumen cannulas on voluntary intake and rumen fermentation. Trop. Anim. Prod. 2:1
169. Pulina, G. y Nudda, A., 2004. “Milk Production” in “Dairy Sheep Nutrition” edited by Giuseppe Pulina, CABI Publishing is a division of CAB International. ISBN 0 85199 681 7.
170. Rainey, F. A. y Janssen, P. H. 1995. Phylogenetic analysis by 16S ribosomal DNA sequence comparison reveals two unrelated groups of species within the genus *Ruminococcus*. FEMS Microbiol. Lett. 129: 69–73.
171. Reilly K, y Attwood, G.T. 1998. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64:907–913.
172. Rémond, B. 1985. Influence de l'alimentation sur la composition du lait de vache. 2. Taux protéique: Facteurs généraux. Bull. Tech. CRZV Theix, INRA, 62: 53-67.
173. Risérus U., Vessby B., Arnlöv J. y Basu S. Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. Am. J. Clin. Nutr. 80(2):279-83.
174. Russell, J.B. 2002. Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition. Ithaca, NY: James B. Russell.
175. Russel A.J.F., Doney J.M. y Gunn R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. J. Agri. Sci. 72: 451–454.
176. Sandeep J. Joseph, Kelly R. Robbins, Enrique Pavan, Scott L. Pratt, Susan K. Duckett y Romdhane Rekaya. 2010. Effect of Diet Supplementation on the Expression of Bovine Genes Associated with Fatty Acid Synthesis and Metabolism. Bioinform. Biol. Insights 4:19–31.
177. Sauviant, D. y Morand-Fehr, P. 2000. Quantitative analysis of dairy goat response to concentrate supply. In: 7th Int. Conf. on Goats, 15–21. Tours, France. 80–81 Tome I.
178. Schmidt, J. y Zsédely, E. 2011. Nutrition of ruminants. University of West-Hungary. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0059_ruminants_nutrition/ch01s02.html.
179. Schroeder G. F., Gagliostro, G. A., Bargo, F., Delahoy, J. E. y Muller. L. D. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. Livest. Sci. 86:1-18.

180. Scollan, N. D., Lee, M. R. F. y Enser, M. 2003. Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on *Lolium perenne* bred for elevated levels of water-soluble carbohydrate. *Anim. Res.* 52: 501–511. INRA, EDP Sciences.
181. Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communications. *Bell Sys. Tech. J.* 27:379-423.
182. Shaver, R. D. 2012. Alternatives to Corn for Dairy Rations. Department of Dairy Science, University of Wisconsin – Madison.
183. Shingfield, K. J., Salo-Väänänen, P., Pahkala, E., Toivonen, V., Jaakkola, S., Piironen, V. y Huhtanen, P. 2005. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows' milk. *J. Dairy Res.* 72:349-361.
184. Sijpesteijn, A. K. 1948. Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. Thesis, University of Leiden, The Netherlands.
185. Simpson, E.H. 1949. The measurement of diversity. *Nature* 1949; 163:688.
186. Smith, V. R. 1941. In vivo studies of hydrogen ion concentrations in the rumen of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 24:659–665.
187. Stockdale, C. R., Waler, G. P., Wales, W. J., Dalley, D. E., Birkett, A., Shen, Z. y Doyle, P. T., 2003. Influence of pasture and concentrates in the diet of grazing dairy cows on the fatty acid composition of milk. *J. Dairy Res.* 70, 267–276.
188. Stewart, C. S., Flint, H. J. y Bryant, M. P. 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Edited by P. N. Hobson & C. S. Stewart. London: Blackie Academic & Professional. Pp. 35-38.
189. Suárez, V.H., y Busseti, M. R. 2004. Lechería Ovina y Productividad de la Raza Pampinta. http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_leche/56-leche_pampinta.pdf.
190. Tapio, T., Snelling, T. J., Strozzi, F. y Wallace, R. S. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *J. Anim. Sci. Biotech.* 8:7.
191. Toral, P.G., Belenguer, I. A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V. y Frutos, P., 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95:794–806.
192. Toral, P.G., Hervás, G., Carreño, D. y Frutos, P., 2016. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.* 99 (2): 1133 – 1144.
193. Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M. y Priolo, A. 2008. Review Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 223–246.
194. Vasta V., Yáñez-Ruiz, D.R., Mele M, Serra A., Luciano, G., Lanza, M., Biondi, L. y Priolo, A. 2010. Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of CSep fed a diet containing added tannins. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(8):2549-2555.
195. Vernon, R. G. 1981. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. In: Christie WW, editor. *Lipid metabolism in ruminant animals*. Oxford, New York: Pergamon Press. Pp. 279–362.
196. Voelker, J.A. y M.S. Allen. 2003a. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 1. Effects on feed intake, chewing behavior and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3542-3552.
197. Wallace, R. J., L. C. Chaudhary, N. McKain, N. R. McEwan, A. J. Richardson, P. E. Vercoe, N. D. Walker y D. Paillard. 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a

- ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. FEMS Microbiol. Lett. 265:195-201.
198. Wanapat M., Cherdthonga, A., Phesatchaa, K. y Kang, S. 2010. Dietary sources and their effects on animal production and environmental sustainability. Anim. Nutr. 1(3): 96-103.
 199. Wattiaux, M. A. y Armentano, L. E. 2007. Metabolismo de carbohidratos en vacas lecheras. Instituto Badcock, Departamento de ciencia en ganado lechero. En: Vacas Lecheras, 2007. http://Badcock.Wisc.Edu/Sites/Default/Flies/De/Es/De_03.Es.Pdf.
 200. Wegmann, U., Louis, P., Goesmann, A., Henrissat, B., Duncan, S. H. y Flint, H. J. 2014. Complete genome of a new Firmicutes species belonging to the dominant human colonic microbiota ('*Ruminococcus bicirculans*') reveals two chromosomes and a selective capacity to utilize plant glucans. Environ. Microbiol. 16: 2879–2890.
 201. Weimer, P. J. 1996. Ruminal cellulolytic bacteria: physiology, ecology and beyond. In: USDA-ARS Proceedings of the Dairy Forage Research Center Conference with the Dairy and Forage Industries, Madison, WI. pp. 53–60.
 202. Weimer, P. J., Stevenson, D. M. y Mertens, D. R., 2010. shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. J. Dairy Sci. 93:265–278.
 203. Willems, A., Amat-marco, M. y Collins, M. 1996. Phylogenetic Analysis of *Butyrivibrio* Strains Reveals Three Distinct Groups of Species within the *Clostridium* Subphylum of the Gram-Positive Bacteria. Int. J. Sys. Bacteriol. pp. 195-199.
 204. Wong, Yoo Kim, Yooheon Park, Seong-Ho Lee, Seung J. Baek y Yeonhwa Park. 2015. Isomer specificity of conjugated linoleic acid on suppression of osteosarcomas. J. Nat. Sci. (JNSCI) 1 (4): 67.
 205. Xiong, B.H., Lu, D.X. y Zhang, Z.Y. 2002. Effect of changing the molar ratio of acetate to propionate in rumen fluid on rumen fermentation and some blood indexes. Acta Vet. et Zootech. Sinica 33:537–543.
 206. Yu, Z. y Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA 722 from digesta and fecal samples. Biotechniques 36: 808-812.
 207. Zambom, M. A., Alcalde. C. R., da Silva Kazama, D. C., Martins, E. N., Hashimoto, J. H., Makoto Matsushita, M., Oliveira Ramos, C. E. C. y Grande, P. A. 2012. Soybean hulls replacing ground corn in diets for early lactation Saanen goats: intake, digestibility, milk production and quality. R. Bras. Zootec. 41 (6):1525-1532.
 208. Zambom, M. A., Alcalde, C. R., Gomes, L. C., Ramos, C. E. C. O., Rossi, R. M. y Kazama, D. C. S. 2017. Effect of soybean hulls on lactation curves and the composition of goat milk. Rev. Bras. Zoot. 46(2):167-173.
 209. Ze, X., Ben David, Y., Laverde-Gomez, J. A., Dassa, B., Sheridan, P. O., Duncan, S. H., Louis, P., Henrissat y B., Juge, N. 2015. Unique organization of extracellular amylases into amyloosomes in the resistant starch-utilizing human colonic Firmicutes bacterium *Ruminococcus bromii*. MBio 6, e01058-15.
 210. Zenou, A. y Miron, J. 2005. Milking performance of dairy ewes fed pellets containing soy hulls as starchy grain substitute. Small Rum. Res. 57:187-192.
 211. Zervas, G., Fegeros, K., Koytsotolis, K., Goulas, C. y Mantzios, A. 1998. Soy hulls as a replacement for maize in lactating dairy ewe diets with or without dietary fat supplements. Anim. Feed Sci. Tech 76: 65-75.

212. Zhao, L. Meng, Q., Li, Y. Wu, H., Huo, Y., Zhang, X. y Zhou, Z. 2018. Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrateadapted steers. BMC Microbiology, 18:21.

ANEXOS

1. Fotografías de los ensayos:



Figura 1. Ovejas de la raza Pampinta seleccionadas para los ensayos.



Figura 2. Animales alojados en corrales individuales, con comederos separados para forraje y suplemento, en el Galpón de Metabolismo ubicado en el Departamento de Producción Animal, FAUBA.



Figura 3. Forraje fresco cortado y ofrecido en comedero al 2% del PV. Medición de consumo de forraje y de suplemento por diferencia entre oferta y remanente.



Figura 4. Medición de digestibilidad *in vivo* por medio de arneses. Colección de heces para analisis de MS y composicion química en laboratorio.



Figura 5. Muestreo de líquido de rumen para caracterización de ambiente ruminal (pH, AGVs totales, ácido acético, propiónico, butírico, láctico, nitrógeno amoniacal) y analisis de ácidos grasos.



Figura 6. Tambo experimental ovino, Departamento de Produccion Animal, FAUBA. Ordeñe diario en dos turnos (08:00 y 16.00hs) por medio de ordeñadora de una bajada con tarro lechero.



Figura 7. Medición de la producción de leche individual y toma de muestras para composición química (% proteína, % grasa, % sólidos totales) y para ácidos grasos.



Figura 8. Extracción de grasa de la leche, metilación básica y análisis por cromatografía gaseosa (Laboratorio de Alimentos, INTA Castelar).



Figura 9. Extracción de ADN genómico de muestras de contenido ruminal (fase sólida + fase líquida) congeladas a -80°C utilizando el procedimiento de Yu y Morrison (2014) para análisis de microbioma. Bioscience Laboratory - Teagasc, Grange, Irlanda.

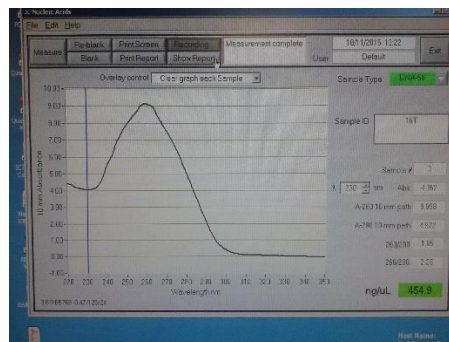


Figura 10. Cuantificación del ADN extraído del contenido ruminal por medio de Nanodrop 1000. Bioscience Laboratory - Teagasc, Grange, Irlanda.

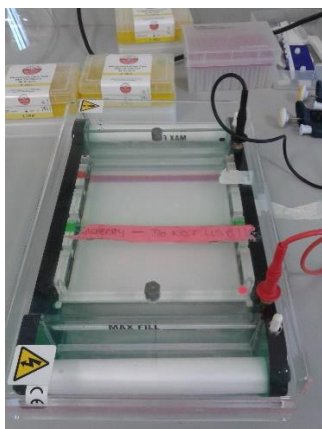


Figura 11. Corrida de ADN en gel de agarosa 2% y amplificación por PCR. Bioscience Laboratory - Teagasc, Grange, Irlanda.



Figura 12. Librería genómica preparada para secuenciación por medio de Plataforma Illumina MiSeq. Bioscience Laboratory - Teagasc, Grange, Irlanda.

2. Presentaciones a congresos derivadas de la tesis:

- **Miccoli, F. E.**, Colombatto, D. and Palladino, R. A., 2019. *Rumen microbiome and fermentation interaction in dairy ewes under different supplementation using 16S rRNA Illumina amplicon sequencing (Accepted)*. ADSA Annual Meeting, Cincinnati, Ohio – Estados Unidos. Invited speaker en la sección “Omics Application in Small Ruminants: Current Situation, Limitations, and Opportunities for the Future”.
- **Miccoli, F. E.**, Colombatto, D. and Palladino, R. A., 2018. *Rumen fatty acid profile of dairy ewes fed contrasting sources of energy supplementation*. ADSA Annual Meeting, Knoxville, Tennessee – Estados Unidos. J. Dairy Sci. Vol. 101, Supplement 2.
- **Miccoli, F. E.** Perez, C. D., Colombatto, D., Danelón, J. L. and Palladino, R. A., 2017. *Milk fatty acid profile of dairy ewes fed contrasting sources of energy supplementation*. ADSA Annual Meeting, Pittsburgh, Pennsylvania – Estados Unidos.
- **Miccoli, F.**, M.S. McCabe, P. Cormican, D. Colombatto, J.L. Danelón, D.A. Kenny and R.A. Palladino, 2016. *Rumen microbiome of dairy CSeep under different supplementation using 16S rRNA Illumina amplicon sequencing*. 39° Congreso Argentino de Producción Animal, Tandil. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 36 Supl. 1: 197 (2016).
- **Miccoli, F.**, M.S. McCabe, P. Cormican, D. Colombatto, J.L. Danelón, D.A. Kenny and R.A. Palladino, 2016. *Rumen microbiome of dairy CSeep under different supplementation using 16S rRNA Illumina amplicon sequencing: Genera level*. 39° Congreso Argentino de Producción Animal, Tandil. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 36 Supl. 1: 198 (2016).
- **Miccoli, F. E.**, Danelón, J. L., Tijera, R., Canónico, R., Martínez, R., Hidalgo, F., Colombatto, D., Allocati, P., Wawrzkievicz, M. y Palladino, R. A., 2014. *Suplementación energética contrastante de ovejas lecheras: ambiente ruminal*. 37° Congreso Argentino de Producción Animal, Buenos Aires. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 34 Supl. 1: 373 (2014)
- **Miccoli, F. E.**, Danelón, J. L., Wawrzkievicz, M., Álvarez Ugarte, D., Allocati, P., Cantet, J. M., Martínez, R. y Palladino, R. A., 2013. *Suplementación energética contrastante de ovejas lecheras consumiendo raigrás*. 36° Congreso Argentino de Producción Animal, Corrientes. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 34 Supl. 1: 152 (2013)

3. Estancias doctorales de formación en el extranjero:

2015. Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) of Beijing, China. Abril-Mayo. Director: Dr. Dengpan Bu (CAAS) y Dr. Alejandro Palladino (IMPA-CONICET,

FAUBA y FCA-UNLZ). Asistencia y disertación en jornadas científicas; presentación de avances del proyecto de investigación FCA-UNLZ 2014-2016 (NI/A222); capacitación en técnicas de laboratorio referentes al cultivo *in vitro* de células epiteliales de glándula mamaria; técnica de electroforesis y PCR; visita a laboratorio de microbiología de rumen con sistema de fermentadores artificiales.

2015. Animal and Grassland Research and Innovation Centre, Teagasc Grange, República de Irlanda.

Noviembre-Diciembre. Dirección: Dr. David Kenny (Principal Research Scientist, Teagasc Grange), supervisión: Dr. Matthew McCabe. Análisis de comunidades microbianas del rumen en el marco de los estudios de doctorado; capacitación en técnicas de biología molecular relacionadas con la extracción y secuenciación de DNA; interpretación de datos de secuenciación mediante la colaboración del Dr. Cormikan, especialista en bioinformática. Los análisis de resultados se continuaron en Argentina con la colaboración del Dr. McCabe desde Irlanda y la colaboración del Dr. Edgardo Salvatierra (CONICET). Adicionalmente, se realizaron dos cursos de bioinformática: uno en FAUBA, a cargo del Dr. Marcelo Soria y otro en IMPaM, CONICET, dictado por las Dras. María Luján Cuestas y Cecilia Quiroga. Por último, un curso de análisis de datos metagenómicos en CERZOS-CONICET (Bahía Blanca), a cargo del Dr. Leonardo Erijman y la colaboración de los Dres. Leandro Guerrero y Esteban Orellana.

4. Disertaciones en eventos científicos derivadas de la tesis:

2018. “*Rumen fatty acid profile of dairy ewes fed contrasting sources of energy supplementation*”. Oral presentation in the Small Ruminant section, ADSA Annual meeting 2018, Knoxville, Tennessee, **USA**.

2017. “*Suplementación energética contrastante en ovejas: performance animal y calidad de leche*”. Seminario del área de Alimentos, Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA Castelar, 23 de agosto de 2017. **INTA**.

2016. “*Microbioma bacteriano ruminal: pasado, presente y futuro*”. Conferencia plenaria de la sección de Nutrición Animal, 39° Congreso Argentino de Producción Animal. **AAPA**.

2015. “*Effect of feeding system on milk production and composition*”. Oral Presentation in CAAS-ICRAF Joint Lab on Agroforestry and Sustainable Animal Science Workshop May 2015, **Beijing, China**.